



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
Departamento de Estomatología
PROGRAMA DE DOCTORADO EN ODONTOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN “IN VITRO” DEL
COMPORTAMIENTO EN DENTINA AFECTADA
POR CARIES DE UN ADHESIVO
BIOACTIVO/BIOMIMÉTICO EXPERIMENTAL
FRENTE A DIVERSOS SISTEMAS COMERCIALES.**

Memoria para optar al grado de doctor, presentada por:

Álvaro Ferrando Cascales

Bajo la dirección de los Doctores:

Agustín Pascual Moscardó (Universidad de Valencia) y

Salvatore Sauro (Universidad CEU Cardenal Herrera)

Valencia. Junio 2020

INFORME DIRECTORES Y TUTOR PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director / Codirector.

1.- Nombre y apellidos: Agustín Pascual Moscardó. N.I.F. 22528673N. Departamento de Estomatología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia. Valencia.

2.- Nombre y apellidos: Salvatore Sauro. N.I.F. Y1229703E. Departamento de Odontología. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad CEU Cardenal Herrera. Valencia.

Tutor.

Agustín Pascual Moscardó. N.I.F. 22528673N. Departamento de Estomatología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia. Valencia.

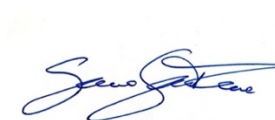
En calidad de directores y tutor de la memoria para optar al grado de doctor:
EVALUACIÓN “IN VITRO” DEL COMPORTAMIENTO EN DENTINA AFECTADA POR CARIES DE UN ADHESIVO BIOACTIVO/BIOMIMÉTICO EXPERIMENTAL FRENTE A DIVERSOS SISTEMAS COMERCIALES.

de D. Álvaro Ferrando Cascales, estudiante del Programa de Doctorado **3143 Odontología** (RD99/2011) de la Universidad de Valencia, emiten un informe *favorable* para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Valencia a 14 de mayo de 2020.

Fdo. Prof. Dr. Agustín Pascual Moscardó.

Fdo. Prof. Dr. Salvatore Sauro.



DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS.

A Majo, mi amor y compañera, empecé esta andadura con ella en 2016 y la acabo en 2020 orgulloso de seguir como el primer día. Estuvo en el comienzo, firme en el desarrollo, empujándome al tren y recogéndome exhausto, así como dedicándome muchas horas para organizar los resultados y ayudándome incluso en el laboratorio de la universidad en momentos de cuestionamiento. Es la última responsable de la organización de esta tesis y maquetado final. Gracias por siempre. Sin ti hubiera sido mucho más difícil.

A mis padres y a mi hermano, que jamás dudaron de mi capacidad de sacrificio, y que siempre me alentaron a conseguir este sueño de realización personal y profesional. Nunca olvidaré los dos años de mis padres viviendo en Valencia, a pesar de estar para y por el ocaso de mi abuela, siempre me reconfortaron tras las jornadas de trabajo. Su logística me supo a gloria, pasar de los hostales al calor del hogar familiar no tiene precio, y sin duda fue un impulso para aumentar el ritmo de la tesis.

A mis directores, Agustín y Salvatore, que allá por el 2016 supieron ver la ilusión “naive” de un dentista movido por la curiosidad científica. Sin ellos, el fundamento y originalidad de este trabajo hubieran sido imposibles de recrear. Gracias por confiar en mí hasta el final, mi orgullo de ser vuestro doctorando no se puede plasmar en papel.

A todo el personal de la Universidad de Valencia, incluyendo bedeles, que aguantaron con mi única presencia en la facultad muchos sábados por la mañana hasta el cierre.

Gracias a toda la Universidad de Valencia, de todo corazón, por acoger a un murciano en vuestro seno.

¿Por qué ad astra per áspera?

*“Porque es una filosofía de vida,
porque las estrellas son alcanzables,
porque el camino más difícil siempre enorgullece y
porque la facilidad no es sinónimo de vida”*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	Contextualización de la caries dental.	13
1.1.	<i>Capa superficial o capa de dentina infectada (DI).</i>	22
1.2.	<i>Capa profunda o de dentina afectada por caries (DAC).</i>	23
1.2.1.	Capa turbida.	23
1.2.2.	Zona transparente o translúcida.	24
1.2.3.	Zona subtransparente.	24
1.3.	<i>Adhesión a DAC.</i>	25
1.4.	<i>Justificación de la investigación.</i>	27
1.5.	<i>Remineralización Biomimética de la DAC.</i>	29
1.5.1	Mecanismos de la degradación de la interfaz adhesiva.	30
1.5.1.1	Degradación del colágeno dentinario mediada por enzimas.	30
1.5.1.2	Hidrólisis de la matriz polimérica adhesiva.	30
1.5.1.3	La hidrólisis de la molécula de acoplamiento de silano (Si-O-Si).	31
1.5.2	Descripción de proceso molecular de remineralización.	31
1.6	<i>Materiales con capacidad remineralizante biomimética de la DAC.</i>	35
1.6.1	Materiales basados en el ionómero de vidrio.	36
1.6.1.1	Convencionales.	36
1.6.1.2	Modificados con metal.	36
1.6.1.3	Modificados con resina.	36
1.6.1.4	Propiedades del monómero.	37
1.6.2	Materiales basados en pretratamientos “bioactivos” de la dentina.	39
1.6.3	Materiales experimentales adhesivos liberadores de iones.	41
1.7	<i>Conclusión de la introducción e importancia clínica.</i>	44
2. OBJETIVOS, DISEÑO DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS NULA.		47
2.1.	<i>Objetivos específicos.</i>	49
2.2.	<i>Diseño del estudio.</i>	49
2.2.1	Breve descripción de las técnicas analíticas utilizadas.	51
2.2.1.1	Ensayo de microtensión (μ TBM).	51
2.2.1.2	Microscopía electrónica de barrido (MEB).	51
2.2.1.3	Microanálisis MEB-EDX.	52
2.2.1.4	Microscopía confocal.	52
2.2.1.5	Microdureza.	53
2.2.1.6	Microrradiografía Transversal (MRT).	53
2.2.1.7	Microscopía electrónica de transmisión (MET).	53
2.3.	<i>Hipótesis nula.</i>	54

3. MATERIAL Y MÉTODO.	55
3.1. <i>Búsqueda bibliográfica.</i>	57
3.2. <i>DAC “natural”.</i>	58
3.2.1. Diseño del estudio.	58
3.2.2. Preparación de los especímenes.	59
3.2.2.1. Material y equipamiento.	59
3.2.2.2. Proceso.	61
3.2.3. Materiales restauradores y adhesivo experimental.	65
3.2.3.1. Composición del adhesivo experimental.	65
3.2.3.2. Modo de empleo del adhesivo experimental.	66
3.2.4. Ensayo de microtensión (μ TBM).	68
3.2.4.1. Preparación de los especímenes para el corte y obtención de barritas.	68
3.2.4.2. Montaje de barritas en las portas, máquina de ensayo (μ TBS) y modos de fractura.	69
3.2.5. Microscopía electrónica de barrido (MEB).	71
3.2.6. Microanálisis MEB-EDX.	73
3.2.7. Microscopía confocal.	74
3.2.8. Microdureza.	76
3.2.9. Análisis estadístico.	77
3.3. <i>DAC “artificial”.</i>	79
3.3.1. Diseño del estudio.	79
3.3.2. Preparación de los especímenes.	80
3.3.2.1. Material y equipamiento.	80
3.3.2.2. Proceso.	82
3.3.3. Material de restauración.	83
3.3.4. Fase de remineralización.	84
3.3.5. Microrradiografía Transversal (MRT).	85
3.3.6. Microdureza.	86
3.3.7. Microscopía de fluorescencia y confocal.	86
3.3.8. Microscopía electrónica de transmisión (MET).	87
3.3.9. Análisis estadístico.	87
4. RESULTADOS.	89
4.1. <i>DAC “natural”.</i>	91
4.1.1. Ensayo de μ TBM.	91
4.1.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB).	100
4.1.2.1. AU-SE.	100
4.1.2.2. OPT.	103
4.1.2.3. CIVMR.	106

4.1.2.4. EXP-ER.	109
4.1.2.5. EXP-SE.	112
4.1.3. Microanálisis MEB-EDX.	115
4.1.4. Microdureza.	123
4.1.5. Microscopía confocal.	125
4.1.5.1. AU-SE.	125
4.1.5.2. OPT.	127
4.1.5.3. CIVMR.	129
4.1.5.4. EXP-ER.	131
4.1.5.5. EXP-SE.	133
4.2. DAC “artificial”.	136
4.2.1. Análisis microrradiográfico (MRT) y microdureza.	136
4.2.2. Fluorescencia y microscopía confocal.	138
4.2.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET).	139
5. DISCUSIÓN.	141
5.1. Material y método DAC “natural”.	143
5.1.1. Método de obtención de la DAC.	143
5.1.2. Procesamiento de especímenes para la obtención de barritas para μ TBM.	144
5.1.3. Ensayo de μ TBM.	145
5.1.3.1. Justificación de la prueba.	145
5.1.3.2. Mecánica de los ensayos de μ TBM-problemática.	146
5.2. Material y método DAC “artificial”.	147
5.3. Resultados DAC “natural”.	148
5.3.1. Microtensión (μ TBM).	148
5.3.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB).	152
5.3.3. Microanálisis MEB-EDX.	154
5.3.4. Microdureza.	159
5.3.5. Microscopía confocal.	160
5.4. Resultados DAC “artificial”.	162
5.4.1. Mineralización (MRT) y microdureza.	162
5.4.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET).	167
6. CONCLUSIONES.	169
6.1. Objetivos específicos.	171
6.2. Hipótesis Nula.	171
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.	173

8. BIBLIOGRAFÍA.	177
9. GLOSARIOS.	191
9.1. <i>Glosario de abreviaturas.</i>	193
9.2. <i>Glosario de términos.</i>	194
10. ANEXOS.	
10.1. <i>Anexo 1. Artículo científico publicado en la revista Dental Materials.</i>	
10.2. <i>Anexo 2. Certificado del Comité de Ética de la Universidad de Valencia.</i>	
10.3. <i>Anexo 3. Poster presentado en el Congreso CED-IADR/NOF. Oral Health Research Congress. Madrid, 2019.</i>	
10.4. <i>Anexo 4. Tablas estadísticas de los resultados sobre muestras de DAC “natural”.</i>	
10.5. <i>Anexo 5. Tablas resumen de los resultados obtenidos en la prueba de microdureza sobre las muestras de DAC “artificial”.</i>	

1. Introducción.

1. INTRODUCCIÓN.

Contextualización de la caries dental.

La caries dental es una de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial, por aportar un dato epidemiológico de nuestro país, que pone de manifiesto su dimensión actual, destacamos el estudio de Obregón-Rodríguez y cols. publicado en 2019 (1), donde establecieron la prevalencia de caries en una muestra de 1.843 niños gallegos de entre 12-15 años de edad, concluyendo que a los 12 años había una prevalencia de caries del 39%, mientras que a los 15 se llegaba ya al 51%.

Además de la prevalencia de caries “primaria”, otro aspecto fundamental de gran relevancia clínica es la caries “secundaria o recidivante”. La caries secundaria se considera la principal causa de fallo de restauración dental y por tanto constituye uno de los mayores desafíos clínicos. Sin embargo, su prevalencia en la práctica diaria aún no está clara, lo que impide una estimación precisa de su impacto en los costos de la atención médica. Tenemos que tener en cuenta que las restauraciones de composite fallan de 2 a 3.5 veces más que las de amalgama (2). Por citar un estudio en este sentido, destacamos el realizado en la universidad de Leuven (Bélgica) sobre un total de 4.036 restauraciones. Fueron examinados 450 pacientes clínica y radiográficamente para detectar la presencia de caries secundaria. Sus resultados fueron de 146 restauraciones con recidiva de caries, lo que da una prevalencia general de 3.6% (3). Por otra parte, se demostró que el material restaurador, la localización de la restauración, el riesgo de caries del paciente y el hábito tabáquico son factores importantes, ya que la prevalencia de caries secundaria fue significativamente mayor en restauraciones de composite clase II, pacientes con alto riesgo de caries y fumadores. Los márgenes subgingivales de las restauraciones fueron afectados por caries recidivantes con mayor frecuencia, probablemente debido a la mayor presencia de dentina afectada por caries (DAC) que contiene a su vez mayor cantidad de metaloproteinasas de la matriz (MMPs), responsables de favorecer la degradación de la interfaz dentina-resina (2).

Etiológicamente está demostrado el origen infeccioso bacteriano de la caries, actualmente se atribuye a una disbiosis polimicrobiana causada por patobiontes (4), y es contraída en la primera infancia, tan pronto como los dientes primarios comienzan a erupcionar, a partir de los padres o cuidadores mediante un intercambio de saliva como el que puede ocurrir cuando se comparten los utensilios de comer.

Históricamente, la caries dental se ha tratado mediante escisión quirúrgica, aplicando el concepto clásico de eliminación total de la lesión, hasta tejido “sano”, y estableciendo sistemas de retención y estabilidad basados en la geometría cavitaria. La sólida estructura dental tenía que sacrificarse para compensar las deficiencias en las propiedades físicas de los diversos materiales restauradores como la amalgama de plata (5).

Con el avance de la odontología, el modelo de tratamiento de la caries cambió. La prevención de caries y una mayor conservación de la estructura dental eran posibles. Edelstein y cols. en 1994 (6), establecieron que esta reorientación impulsaba al dentista a un nuevo rol como cariólogo clínico. También habló sobre las barreras en la transferencia de información, que podrían estar relacionadas con la falta de lenguaje compartido entre científicos y clínicos. Inclusive la palabra “*caries*” se usa de manera diferente por los científicos y los clínicos; los científicos se refieren a ella como un proceso, y los clínicos la utilizan para identificar las lesiones que resultan de ese proceso.

Sin lugar a duda, la adhesión, junto a los implantes dentales, revolucionaron por completo la odontología en la segunda mitad del siglo XX. En lo que respecta a la adhesión, gracias a los conceptos pioneros propuestos por Buonocore en 1955 (7), a partir de la introducción del grabado ácido al esmalte, en combinación con los estudios de Bowen en 1965 (8), surgió verdaderamente la técnica adhesiva (9) . Con el desarrollo de las técnicas adhesivas en esmalte y luego en dentina, se consiguió eliminar completamente la necesidad de retención macromecánica para

mantener una restauración artificial en una cavidad o superficie dental, tanto en el caso de restauraciones directas como indirectas. Tal revolución alteró y cambió definitivamente hace décadas los conceptos de preparación cavitaria, posibilitando mayor preservación de la estructura dentaria remanente sana. Además, introdujo conceptos estéticos en la práctica odontológica habitual, debido a la utilización de materiales del mismo color del diente (9,10).

La técnica adhesiva a esmalte contribuyó a mejorar y afianzar el sellado marginal de restauraciones de resina compuesta y cerámica, gracias a la alteración de la superficie mediante un tratamiento químico que generaba una nueva superficie a la que los materiales actuales pueden adherirse. La clave del éxito está en la propia histología del esmalte, ya que en un 96% es una estructura prismática/cristalina inorgánica, susceptible al tratamiento con ácido ortofosfórico, que induce una disolución de esta, generando unos patrones de grabado superficiales retentivos donde se puede infiltrar la resina.

El resultado final es una mayor capacidad de adherencia de la resina debido a varios factores que fueron ya descritos por Buonocore y que se pueden resumir en los siguientes: (a) un tremendo aumento en el área de superficie debido a la acción del ataque ácido; (b) la exposición del marco orgánico del esmalte (prismas) formando una red alrededor de la cual se puede adherir o infiltrar el acrílico; (c) la eliminación de la superficie del esmalte viejo, inerte, exponiendo una superficie nueva y reactiva más favorable para la adhesión; y (d) la presencia en la superficie del esmalte de una capa saturada de grupos fosfato altamente polares, derivados del ácido utilizado (7).

Por otro lado, tenemos la dentina donde hasta el día de hoy tenemos “incertidumbre adhesiva”, ya que en resumen comprende la mayor parte del diente y se trata de un sustrato poco favorable para la adhesión a largo plazo. La razón fundamental, radica como no podía ser de otra manera, en su histología. Está compuesta principalmente por cristales de hidroxiapatita, 50-70% en volumen de hidroxiapatita deficiente en

calcio y rica en carbonato [HA: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$]. El tamaño del cristal en la dentina (5 nm x 30 nm x 100 nm) es menor que en el esmalte. La dentina también contiene un 30% de componente orgánico que está representado por:

1) 90% de colágeno tipo I con cantidades muy mínimas de colágeno tipo III y V, y 10% de proteínas no colágenas (PNCs) ricas en agua, así como proteoglicanos y glucosaminoglucanos (9).

2) El 20% del volumen de la dentina está compuesto por agua libre (por ejemplo, líquido intratubular) y agua unida (11). Las PNCs pueden unirse selectivamente a diferentes superficies de los cristales de apatita, guiando su crecimiento en ciertas direcciones y permitiendo diversas formas del cristal (por ejemplo, cristales en forma de aguja y en forma de placa). De hecho, los cristales de HA están estrechamente empaquetados e incorporados dentro de las regiones de separación entre las fibrillas de colágeno (12,13).

La composición de la dentina puede variar en diferentes áreas del diente, dependiendo de su proximidad al tejido pulpar, así como de si la matriz está desmineralizada o si la lesión cariosa está detenida o activa. Estas diferencias pueden influir en gran medida en las propiedades mecánicas de la dentina, así como en el éxito de la unión a la dentina (14).

Para comenzar el procedimiento adhesivo, el componente mineral de la superficie y del subsuelo se elimina totalmente mediante un grabado ácido con ácido ortofosfórico, de esta técnica surgieron los clásicos adhesivos catalogados como “grabado y enjuague” (“etch and rinse”, ER) (15). También podemos optar por una remoción parcial del componente mineral con imprimaciones ácidas más débiles, que constituirían los denominados adhesivos “autograbantes” (“self-etch”, SE), más contemporáneos. En este último caso, la matriz de colágeno expuesta se infiltra con monómeros de resina adhesiva solvatada, idealmente encapsulan toda la matriz con resina y se forma la llamada “*capa híbrida*” (CH), que después de la

polimerización del monómero, ancla firmemente el adhesivo y la restauración superpuesta a la dentina. Este último mecanismo fue revisado por Van Meerbeek y cols. en 2011 , *“AD-concept”* , demostrando que era mucho mejor utilizar imprimaciones ácidas débiles por encima de un pH 2 (16) .

Sin embargo, en realidad, los monómeros adhesivos son incapaces de encapsular completamente la matriz de colágeno, dejando fibrillas total o parcialmente expuestas en el fondo de la CH, sin la protección de la resina polimerizada. Además, existen monómeros hidrofílicos en los adhesivos que causan una alta absorción de agua y generan una CH que se comporta como una membrana permeable después de la polimerización (17), permitiendo el movimiento del agua a través de la interfaz unida (18). El movimiento del agua comienza como un mecanismo de difusión, seguido de la creación de grandes canales llenos de agua que degradan rápidamente la fase hidrofílica del adhesivo. A medida que la matriz de colágeno previamente infiltrada en resina se solubiliza, las fibrillas de colágeno insolubles subyacentes quedan totalmente expuestas y se vuelven más vulnerables al ataque de enzimas proteolíticas endógenas (19). Las proteasas de la matriz son hidrolasas, añaden agua a través de enlaces peptídicos específicos para ir rompiendo el polímero de colágeno en unidades más pequeñas.

Cuando se utilizan adhesivos ER, la presencia de agua residual en la dentina grabada con ácido, puede disminuir adicionalmente la polimerización de los monómeros adhesivos, contribuyendo a una mayor permeabilidad dentro de la capa adhesiva (15). Aunque los adhesivos SE deberían encapsular teóricamente las fibrillas de colágeno completamente, ya que la infiltración se produce de manera simultánea a la desmineralización, muchos estudios han mostrado cierta nanofiltración dentro de los adhesivos SE (20) , incluso en ausencia de una zona de colágeno desmineralizado expuesta detectable (21). Además, los solventes residuales en la CH contribuyen a la infiltración incompleta de monómeros de resina en matrices de fibrillas de colágeno llenas de agua, incluso puede entrar más agua en la CH no solo durante el procedimiento de unión, sino también más tarde (15).

Como resultado, encontramos porciones de CH que siempre contienen áreas con agua y resina, como se ha demostrado con la microscopía electrónica de transmisión (MET) usando trazadores solubles en agua.

Aunque estas zonas ricas en agua son generalmente escasas, inmediatamente después de la unión, aumentan de tamaño con el tiempo (22), lo que indica que el agua reemplaza gradualmente a los otros componentes de la CH. La falta de protección de la resina y la presencia de agua deja a las fibrillas de colágeno desmineralizadas vulnerables y susceptibles a la degradación hidrolítica completa a través del tiempo. La degradación de las fibrillas de colágeno, junto con la degradación de los componentes de resina hidrofílica, conduce a la destrucción final de la CH y a la pérdida de la fuerza de unión a la dentina con el envejecimiento (17).

Por todas estas razones, la consolidación de la técnica adhesiva en dentina llevó mucho más tiempo, debido a las mencionadas diferencias histológicas y a la complejidad ultraestructural de la dentina en relación al esmalte (23). Aún en la actualidad, a pesar de los avances nanotecnológicos, existen problemas en lo que se refiere al mantenimiento a largo plazo de la CH, debido a la mencionada e inexorable degradación de la interfaz adhesiva en dentina sana (DS), mediada por actividad enzimática de MMPs, a la que se suma la propia degradación monomérica de las diferentes formulaciones químicas de los adhesivos comerciales contemporáneos. Este hecho, se hace mucho más patente en la DAC donde la inestabilidad estructural del colágeno y la pérdida mineral, predisponen “a priori” a un envejecimiento más acelerado de la CH (9,10,16,24).

El comportamiento clínico clásico frente a la caries dentinaria se lo debemos, sin lugar a duda, al grupo de investigación dirigido por el Prof. Fusayama (25,26). Ya en sus primeros trabajos llegaron a la conclusión de que el color y la dureza de la dentina cariada no se corresponden con su grado de deterioro por la invasión bacteriana, además, color y dureza no son criterios fáciles de aplicar con precisión en clínica.

Massler, en 1967 (27), ya describió una lesión activa como la que se caracteriza por una colonia bacteriana activa en la superficie dental y una capa muy amplia de dentina desmineralizada debajo, que contiene menos microorganismos patógenos. Este autor posteriormente señaló que la mayoría de las lesiones encontradas clínicamente eran una combinación de lesiones activas y detenidas. En la periferia de la lesión, una lesión activa se propaga a menudo debajo del esmalte, a lo largo de la unión esmalte-dentina, mientras que el área central, más fácil de limpiar, es dura y parcialmente remineralizada.

A continuación, creemos que es importante describir con más detalle los diferentes tipos de sustratos dentinarios que encontramos normalmente en las lesiones cariosas desde un punto de vista clínico e histológico.

Como acabamos de mencionar, la caries dentinaria está formada básicamente por dos capas bien diferenciadas:

1.1. Una capa superficial, que está severamente descalcificada, altamente contaminada por bacterias, y no se puede remineralizar fisiológicamente. Esta capa la denominaremos también dentina infectada (DI).

1.2. Una capa profunda, en la que la descalcificación es más moderada y con menos contaminación bacteriana, a la que nos referiremos indistintamente como dentina afectada por caries (DAC).

Estas dos capas presentan características ultramicroscópicas, bioquímicas y fisiológicas diferentes (25,28,29).

1.1 Capa superficial o capa de dentina infectada (DI).

Tiene una consistencia suave y húmeda junto a una alta concentración bacteriana, desde el punto de vista histológico está absolutamente perdida (Fig.1). Los túbulos dentinarios han desaparecido prácticamente o el interior de los que quedan está ocupado por bacterias que proliferan.

Debido a la desmineralización que acompaña al proceso carioso, el diámetro tubular aumenta. Las bacterias van invadiendo la dentina intertubular, facilitado este hecho por la desestructuración de la dentina peritubular, y así los túbulos van fundiéndose unos con otros, dando lugar a la formación de extensas áreas necróticas. Al final, encontramos una dentina intertubular en una situación de desmineralización extrema con las fibras de colágeno completamente desnaturalizadas.

Estudios bioquímicos revelaron que los precursores del colágeno y los enlaces intermoleculares están disminuidos o son inexistentes. Puesto que no hay procesos odontoblásticos vivos, y las fibras colágenas están irreversiblemente dañadas, esta dentina no se puede remineralizar fisiológicamente, y por lo tanto tiene que ser extirpada clínicamente (30).

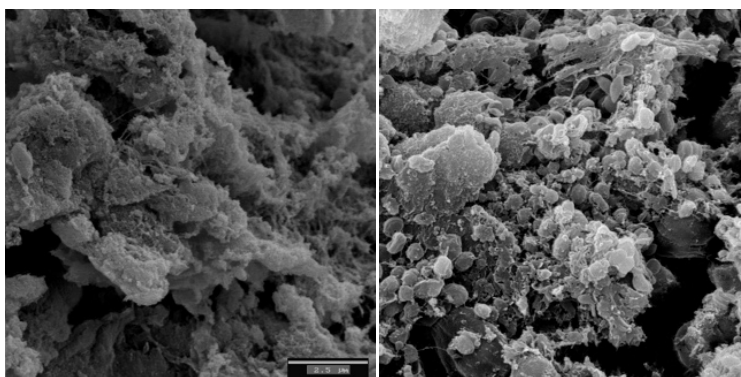


Fig. 1 Ejemplo. MEB-DI.

Se aprecia el colágeno desestructurado e intensa colonización bacteriana.

Cortesía del Dr. Agustín Pascual Moscardó.

1.2 Capa profunda o de dentina afectada por caries (DAC).

Esta capa se puede dividir a su vez en tres áreas, teniendo todas en común que la estructura dentinaria está conservada, en la Fig. 2 podemos ver un ejemplo del aspecto de la DAC al MEB.

1.2.1 *Capa turbida.*

1.2.2 *Zona transparente o translúcida.*

1.2.3 *Zona subtransparente.*

1.2.1 En la capa turbida los procesos odontoblásticos están presentes. La dentina peritubular aquí es densa, y aunque la dentina intertubular está desmineralizada, las fibras colágenas no están desnaturalizadas y presentan sus bandas características con diferentes grados de desmineralización por lo que es fisiológicamente remineralizable (30). Estudios bioquímicos han puesto de manifiesto que los enlaces intermoleculares están presentes pero disminuidos, pero existen muchos más precursores del colágeno que en la DI. Otra característica es que los cristales de hidroxapatita (HA) se encuentran acortados, debido a que la desmineralización afecta en primer lugar a sus extremos (31).

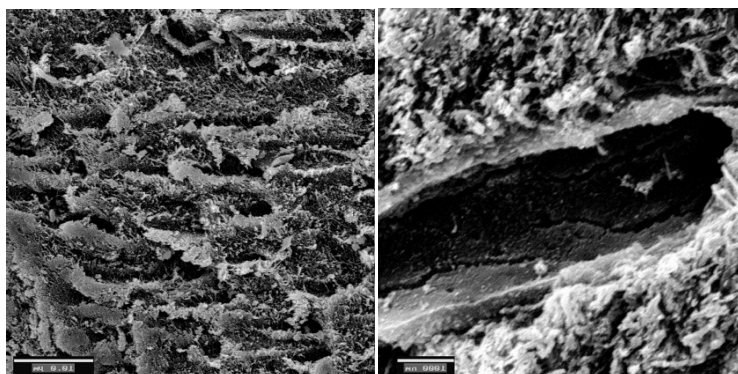


Fig. 2. Ejemplo MEB-DAC.

Se aprecia cierta estructura dentinaria conservada y la sección de un túbulo dentinario vacío a mayor aumento. Cortesía del Dr. Agustín Pascual Moscardó.

1.2.2 En la zona transparente o translúcida, la dentina intertubular se presenta también desmineralizada, pero existe una característica importante y es que los túbulos dentinarios están llenos de cristales de *whitlockita*. Estos cristales son de gran tamaño y más resistentes al ataque ácido de origen bacteriano, esta esclerosis tubular proporciona el aspecto *transparente o translúcido*.

Respecto a los depósitos intratubulares no se sabe con certeza si son un mecanismo de defensa activo o el resultado de un fenómeno cíclico de disolución y precipitación de los cristales debido a la exposición intermitente a pH ácido (26). Lo que sí se ha demostrado es que su presencia disminuye la “permeabilidad dentinaria” de manera significativa, y, por ende, el paso de ácidos, bacterias y demás toxinas bacterianas, constituyendo al final una capa protectora para la pulpa. Por todos estos motivos es una dentina que debemos respetar durante la remoción de la caries.

Algunos autores denominan o equiparan la dentina transparente a la dentina esclerótica (DE), de hecho, el diagnóstico diferencial desde el punto de vista clínico se complica, ya que se trata de una dentina más dura a la exploración como la DE. Sin embargo, aunque el interior de los túbulos puede estar ocupado por cristales de *whitlockita*, se trataría de una dentina significativamente más blanda. Esto se debe a que su matriz intertubular se encuentra al menos parcialmente desmineralizada como consecuencia del proceso carioso, y como ya ha sido demostrado, las propiedades mecánicas de la dentina dependen directamente de la dentina intertubular (31).

1.2.3 Por último, la dentina subtransparente no es más que una zona de transición entre la zona transparente y la DS subyacente, por lo que encontramos menos calcificaciones intratubulares y más áreas de dentina no afectada (26).

Nos quedaría por describir brevemente la dentina esclerótica (DE), una dentina que suele ser producto de procesos de atricción, erosión y/o abfracción, pero que se

parece histopatológicamente a la DAC y que comparte con ella, por ejemplo, que los túbulos dentinarios están obliterados por cristales de *whitlockita*, lo que condiciona que también su permeabilidad se encuentre reducida. Sin embargo, la dentina intertubular no está desmineralizada, al revés, está hipermineralizada.

Respecto al aspecto macroscópico de un tipo de DE, podemos decir que no difiere mucho de la DAC, se trata de la categoría 4 (escala de esclerosis dentinaria de Carolina del Norte), donde la dentina tiene la apariencia de estar vitrificada, amarilla oscura o incluso con un color marrón (31).

1.3 Adhesión a DAC.

Clínicamente, cuando abordamos una caries, la resina se adhiere a una cavidad preparada después de la extracción de la DI, en la cual, el piso de la cavidad consiste comúnmente en DAC con menor eficacia de adhesión debido a la características morfológicas, químicas y físicas que acabamos de describir y que la diferencian de la DS. La debilidad intrínseca de la DAC puede no ser un problema clínico, si hay una dentina y/o esmalte normal circundante que pueda proporcionar una alta resistencia adhesiva (32). Sin embargo, dado que la adhesión al piso de la cavidad está fuertemente influenciada por la tensión de contracción de la resina compuesta, la baja eficacia de la unión a la DAC causaría un mayor deterioro de la interfaz adhesiva en el piso de la cavidad restaurada. Además, cuando se expone la interfaz adhesiva de la DAC al ambiente oral, la mala calidad de la CH de la DAC comprometería la longevidad de la restauración de resina debido a la hidrólisis final de esta junto con las fibrillas colágenas.

En este aspecto resultan muy interesantes los trabajos de Nakajima y cols. en 2011, (33) donde pudieron medir de forma selectiva la resistencia a la tensión en la DAC. En sus diferentes estudios compararon la eficacia adhesiva, obtenida con diferentes sistemas adhesivos en molares cariados, distinguiendo los valores obtenidos en la DAC y en la DS procedente de un mismo espécimen. Para distinguir la DI de la DAC

utilizaron fucsina básica, test de microtensión y determinaron la microdureza de cada espécimen para certificar si era o no DAC. En sus estudios también observaron la interfase generada para cada tipo de adhesivo y dentina con MEB. Los hallazgos más significativos de dichos estudios pueden resumirse de la siguiente forma:

- La resistencia adhesiva es inferior en DAC, comparada con los valores obtenidos en DS procedentes ambos de los mismos especímenes.
- El grosor de la CH formada en DAC es mayor. Esto se debe a que la dentina la encontramos ya desmineralizada previamente, por lo que los adhesivos pueden penetrar más profundo. Sin embargo, no hay correspondencia entre el grosor de esta capa y la resistencia adhesiva final obtenida.
- La microdureza de la DAC es siempre significativamente inferior a la de la DS, aunque otros autores han encontrado que los valores de la zona transparente son semejantes a los de la dentina sana.
- Algunos autores como Arrais y cols. (34), recomiendan realizar una técnica ER con ácido ortofosfórico en concentraciones entre el 32-37%, con el objetivo de retirar de forma más efectiva los cristales intratubulares y así obtener mayor formación de tags de resina principales y laterales.
- Los resultados que obtuvieron ponen de manifiesto que la técnica de adhesión “húmeda” mejora la adhesión no sólo en DS, sino también en DAC. Las nuevas formulaciones de sistemas adhesivos, como son los que se presentan en un solo frasco también aportaban buenos valores de resistencia adhesiva tanto en DS como en DAC.

Las posibles causas que justifican los valores inferiores obtenidos en la DAC son:

- El colágeno de la DAC puede estar alterado por el proceso carioso o bien por efecto del grabado ácido o sustancias coadyuvantes a la remoción de DI.
- La DAC está ya desmineralizada, por lo que el frente de desmineralización tras el grabado es mayor y los adhesivos quizás no puedan infiltrarla completamente. Asumir este hecho supone reconocer que quedará una zona de dentina desmineralizada sin infiltrar, por tanto, más sensible a la degradación vía hidrólisis.
- Por último, los depósitos intratubulares que quedan, impiden la penetración de los monómeros, y por lo tanto, la subsecuente formación de tags de resina con la pérdida del plus de hibridación en las paredes intratubulares que esto supone (33,35).

1.4 Justificación de la investigación.

Remineralizar las lesiones procedentes de la caries dental resulta un enfoque atractivo. Si bien la remineralización del esmalte, un tejido que consta de aproximadamente en un 96% en peso de apatita cristalina, ha sido práctica clínica durante muchos años. La remineralización de la dentina por un proceso químico, es un esfuerzo más desafiante, debido a la presencia de una matriz orgánica que permanece y funcionaría como un andamio que necesita ser remineralizado después de sufrir el ataque carioso (36).

En general, se ha aceptado que de todos los abordajes adhesivos que tenemos actualmente, los de ER de 3 pasos y los SE de 2 pasos son el “estándar de oro” en la adhesión dentinaria. Una razón de su éxito es que la imprimación está separada de los componentes adhesivos propiamente dichos, lo que permite la colocación de una capa adhesiva hidrófoba libre de solvente sobre la imprimación hidrófila. Esto

parece reducir la absorción de agua en la interfaz resina-dentina (16). Además, se ha demostrado que los SE de 2 pasos son menos sensibles a la técnica, por lo tanto, pueden ser más recomendables que los adhesivos ER de 3 pasos cuando tratamos cavidades donde podemos encontrar áreas extensas de dentina (37).

Desafortunadamente, ya hemos comentado que ninguno de estos sistemas adhesivos “**pasivos**” puede compensar la degradación inexorable de la interfase resina-dentina. Sería entonces una buena idea desarrollar sistemas que favorecieran la precipitación mineral, y que pudieran teóricamente llenar de minerales las micro y nano porosidades de la CH, así como inhibir y “refosilizar” las proteasas endógenas de la dentina (38). Esto sería posible si se utilizan materiales y/o procedimientos de unión que puedan favorecer la absorción de minerales dentro de la interfaz de dentina adherida, especialmente en presencia de materiales constituidos a base de resina “inteligente” **bioactiva/biomimética** que pueden liberar iones como el Ca^{2+} por ejemplo (39,40).

Por otro lado, está también ampliamente aceptado que la adhesión en DS no aporta mejores resultados que en DAC. Esta afirmación no se discute actualmente, Isolan y cols. en 2018 (41), publicaron una revisión sistemática y metaanálisis, donde concluyeron tras la revisión de 2.260 artículos que efectivamente la adhesión a DAC representa un mayor reto respecto a la sana, independientemente del enfoque adhesivo utilizado. Aún así, concluyeron “paradójicamente”, si tenemos en cuenta lo comentado anteriormente, que cuando se trata de adherir a DAC, la literatura “in vitro” indica que los adhesivos de ER podrían proporcionar una mayor resistencia de unión que los SE.

Así pues, debido a la gran cantidad de procedimientos adhesivos que realizamos en la clínica diaria sobre DAC, necesitamos perfeccionar las estrategias adhesivas, no sólo de cara a mantener CH en buen estado sino intentar modificarla o al menos “defenderla” de una más que probable futura filtración lateral, favoreciendo la

remineralización biomimética (de dentro-afuera) o precipitación mineral a través de materiales bioactivos que reaccionen en presencia de agua (42).

Este abordaje podría situarse bajo el principio médico de la “*restitutio ad integrum*”, que, además, en odontología, resulta bastante difícil de encontrar, ya que en general se trata de una disciplina donde los tratamientos buscan la reparación de los tejidos dañados a través de un material artificial, más o menos sofisticado, cuyo producto final siempre difiere sustancialmente (a peor) del tejido original afectado, la DS.

Por todo lo expuesto, podemos apelar a que el horizonte de la “remineralización biomimética” de la DAC sería sin duda un camino de desarrollo tecnológico más que justificado, que requiere a continuación una adecuada contextualización científica previa, debido a su elevada complejidad.

1.5 Remineralización biomimética de la DAC.

La remineralización es una forma de deshidratación, ya que desplazamos el agua residual de la dentina y se rellenan los huecos con cristales de apatita (39). Por consiguiente, sería una de las formas de impedir la ya comentada degradación de las fibras colágenas.

Evidentemente no es la única estrategia, existen otras vías descritas en la literatura como introducir inhibidores enzimáticos en los adhesivos, moléculas “*cross-linkers*” como por ejemplo el glutaraldehído o sustancias derivadas de plantas (compuestos polifenólicos) que son menos citotóxicas que el anterior, y mantienen igualmente estables los enlaces inter e intramoleculares del colágeno dentinario. También se puede intentar la remoción del agua residual a través de formulaciones alcohólicas como solventes, “*Ethanol wet bonding*” o por último incorporando moléculas como el dimetil sulfóxido que en última instancia facilitan ostensiblemente la infiltración de la resina (43).

Mención especial merece la utilización de la clorhexidina, un último estudio publicado por Breschi y cols en 2020 (44), reveló que el uso de clorhexidina al 0.2% como primer durante 30 segundos, disminuía la actividad de colagenasas tras 10 años de envejecimiento usando un sistema adhesivo clásico ER en DS.

No obstante, con la remineralización biomimética, tendríamos el plus añadido de la recuperación de las propiedades biomecánicas, además de evitar la degradación de la interfaz adhesiva que se produce básicamente de tres modos y que pasamos a recordar a continuación.

1.5.1 Mecanismos de degradación de la interfaz adhesiva:

1.5.1.1 Degradación del colágeno dentinario mediada por enzimas (por ejemplo, metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y cisteína-catepsinas (CTPs). Lo hemos comentado anteriormente, pero merece la pena destacar que las MMPs y CTPs presentes en la saliva, dentina mineralizada y/o líquido dentinal pueden afectar al proceso carioso de la dentina en las fases tempranas de desmineralización. Los cambios en la estructura de las proteínas no colágenas y el colágeno pueden participar en las disminuciones observadas en las propiedades mecánicas de la DAC y reducir su capacidad de remineralización. Estas enzimas endógenas también permanecen atrapadas dentro de la CH durante el proceso de infiltración de la resina, y los propios agentes de enlace ácidos (independientemente de si utilizamos ER o SE) pueden activarlas. Dado que la impregnación de la resina es frecuentemente incompleta, las matrices de colágeno denudadas, se asocian al agua libre, que sirve como reactivo de escisión del colágeno en presencia de estas enzimas hidrolasas endógenas, contribuyendo finalmente a la degradación de la CH (45).

1.5.1.2 Hidrólisis de la matriz polimérica adhesiva. Este tipo de degradación es mucho más lento en comparación con la proteólisis de las fibrillas de colágeno de

la dentina, aunque varias esterasas pueden acelerar la descomposición de los enlaces éster en (poli) metacrilatos.

1.5.1.3. La hidrólisis de la molécula de acoplamiento de silano (Si-O-Si) también puede ocurrir y causar la separación de las cargas de la matriz del polímero. Este último mecanismo se situaría dentro de la degradación o inestabilidad temporal de la formulación química del propio adhesivo (42).

Para comprender entonces cómo podemos evitar la degradación remineralizando la DAC, hay que comprender primero en qué consiste el proceso remineralizante.

1.5.2 Descripción de proceso molecular de remineralización:

La DS es nuestra referencia, y recordemos que se compone de aproximadamente de un 18% en volumen de fibrillas de colágeno tipo I y proteínas no colágenas (PNCs) que forman un andamio reforzado con la apatita, que representa el 70% de la matriz, el 12% restante son fluidos y agua. La apatita se presenta en dos compartimentos: mineral extrafibrilar, en los espacios que separan las fibrillas, y mineral intrafibrilar, dentro de las fibrillas. Se ha sugerido que los cristales minerales intrafibrilares remanentes, que están presentes dentro del colágeno después de la desmineralización parcial de la dentina, podrían actuar como sitios para la nucleación y el recrecimiento de apatita, lo que facilita la remineralización y la recuperación de las propiedades mecánicas (46).

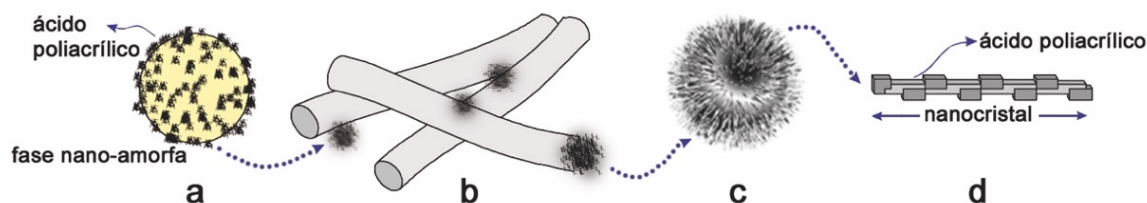
Liu y cols. en 2011 (47), entraron de lleno en el terreno de la biología molecular ultraestructural y demostraron la capacidad de usar moléculas simples no proteicas para recuperar diferentes niveles de jerarquía estructural en el colágeno mineralizado, lo cual significaba la máxima simplicidad en los principios de diseño de biomineralización que utiliza la naturaleza.

La remineralización intrafibrilar y extrafibrilar, puede ocurrir en un andamio de colágeno tridimensional sin minerales, creado en la superficie de la dentina humana, con la dimensión y orden de las disposiciones de cristales de apatita que se aproximan a las de la dentina mineralizada intacta subyacente (13).

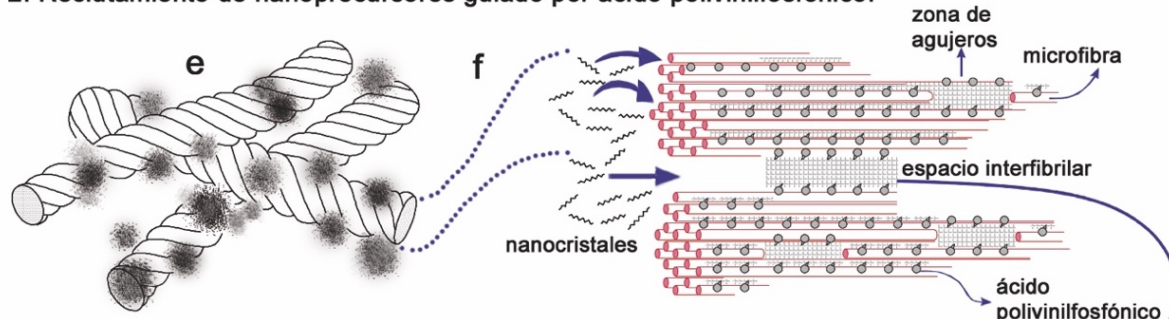
En la Fig. 3 se ilustran esquemáticamente los tres pasos propuestos que pueden suceder durante el proceso de remineralización biomimético:

1. En la primera etapa de inducción de nanoprecusores, la adición de ácido poliacrílico (APA) al sistema de cemento Portland-PCF ,podrían ser donadores otros productos como MI Paste™ o Curodont Repair™ (48), produce nano-precusores de fosfato de calcio amorfo metaestables (PCA).
2. Los nanoprecusores de PCA son lo suficientemente pequeños como para penetrar en una matriz de colágeno desmineralizado.
3. Estas nanoesferas tienen el potencial de transformarse en nano-cristales de apatita que probablemente también estén estabilizados por aniones de APA (49).

1. El ácido poliacrílico induce los nanoprecusores.



2. Reclutamiento de nanoprecusores guiado por ácido polivinilfosfónico.



3. Ensamblaje mesoscópico de nanocristales intermedios.

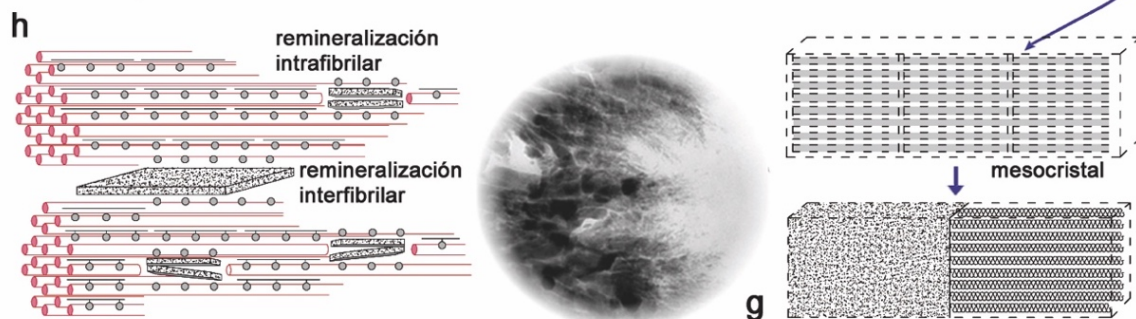


Fig. 3. Proceso de remineralización biomimético (49).

La remineralización funcional y confiable de la interfaz de la DS/resina, así como la creada en la DAC, se debe caracterizar por la deposición de minerales intrafibrilares y extrafibrilares, junto con cristales HA orientados en la misma dirección que en la DS. Esto debería dar lugar al restablecimiento del módulo de elasticidad de las estructuras dentales empobrecidas en minerales dentro de las interfases de unión. Se ha demostrado que el colágeno empobrecido en minerales previamente infiltrado con precursores biomiméticos amorfos se puede remineralizar adecuadamente mediante procesos de cristalización directa (39).

Un aspecto importante observado por Tay, Pashley y cols. en 2008 (49), en sus especímenes, se resume en que la remineralización comenzó desde la base de la capa de dentina desmineralizada hacia la superficie. Esto sugiere que puede haber sustancias diluidas de la dentina mineralizada subyacente que desencadenan el proceso de remineralización. Desde una perspectiva de restauración clínica, es probable que sólo las matrices de dentina parcialmente desmineralizadas puedan ser remineralizadas. Por lo tanto, el proceso biomimético de la remineralización guiada por tejido dentinario debería ser útil en situaciones como la remineralización de la DAC o en las condiciones en que la dentina grabada con ácido ortofosfórico esté infiltrada de forma incompleta por los adhesivos dentinarios.

Bertassoni y cols. en 2011 (46), llegaron a una conclusión parecida en un estudio con lesiones cariosas artificiales donde los resultados también demostraron que la remineralización se producía principalmente en las áreas más profundas de las lesiones, debido a un aumento en la presencia de focos minerales remanentes. Además, los resultados sugieren que, a microescala, la remineralización puede depender de los núcleos minerales intrafibrilares remanentes dentro del colágeno, que se espera que sean más prevalentes en las zonas más profundas y menos desmineralizadas de la DAC.

Por otro lado, también podemos tener remineralización efectiva, aunque no reproduzca la conformación original de DS. Habelitz y cols. en 2014 (36), afirmó que el mineral de apatita se puede formar en la malla de colágeno de la dentina, pero sin asociación a la matriz orgánica o, alternativamente, el mineral puede haber precipitado en el lumen de los túbulos de dentina, lo que indica un tratamiento de remineralización exitoso a medida que aumenta el contenido de mineral cuando se analiza mediante tomografía de rayos X o radiografías dentales. Sin embargo, las propiedades de dicha estructura remineralizada, de manera “no biomimética”, están lejos de los valores obtenidos en el tejido sano, ya que la porción mineral no está integrada activamente con la matriz orgánica. En sus especímenes de lesiones más profundas, encontraron que sólo una parte estrecha, la zona de transición

adyacente entre la DAC y la DS, se recuperó funcionalmente y restauró completamente el módulo elástico y la dureza de la dentina.

En un artículo publicado en 2019 por nuestro grupo de investigación (50), y que constituye una parte importante de este proyecto de tesis doctoral (ANEXO 1), se puso de manifiesto una vía de remineralización “biomimética”, pero también otra “no biomimética”, esta vez mediada por la degradación caustica del colágeno a través de cementos de silicato de calcio como el agregado de trióxido mineral (MTA) y biodentine (BIO).

En resumen, expusimos dos tipos de mecanismos:

- **Remineralización “no biomimética” de la matriz colágena “de fuera-adentro.**
- **Remineralización “biomimética” inter e intrafibrilar de la matriz colágena, “de dentro-afuera”.**

A continuación, primero vamos a pasar a describir con más detalle los *materiales dentales* que serían teóricamente susceptibles de reproducir la vía biomimética, que sería la que vertebraría este proyecto de tesis doctoral.

1.6 Materiales con capacidad remineralizante biomimética de la DAC.

Los materiales remineralizantes se pueden clasificar en tres grupos (51):

1.6.1 Materiales basados en el ionómero de vidrio.

1.6.2 Materiales basados en pretratamientos “bioactivos” de la dentina.

1.6.3 Materiales experimentales adhesivos liberadores de iones.

1.6.1 Materiales basados en el ionómero de vidrio.

El cemento de ionómero de vidrio o ionómero vítreo (CIV), es un biomaterial clásico con un gran campo de utilización en la odontología clásica restauradora y preventiva. Surge en la década de 1970, gracias a los científicos Wilson y Kent (52), sin embargo, ha sufrido modificaciones en su estructura química y composición a través de los años. Antiguamente este cemento era denominado *cemento de polialquenoato de vidrio*, pero es su nombre actual el que tiene estrecha relación con su composición.

Los CIV se componen básicamente de un líquido y un polvo, existiendo distintas modificaciones:

1.6.1.1 *Convencionales.* El polvo está constituido por sílice y alúmina, junto a fluoruros que facilitan su fusión, formando cristales de fluoraluminosilicato. El líquido está compuesto por agua, y una solución de ácidos polialquenoicos (polimaleico, poliacrílico y poliitacónico) a la que se le incorpora ácido tartárico para aumentar el tiempo de trabajo. Estos cementos endurecen por reacción ácido-base exclusivamente.

1.6.1.2 *Modificados con metal.* Al polvo se le añade plata sinterizada y el líquido mantiene su fórmula convencional.

1.6.1.3 *Modificados con resina.* Presentan también la reacción ácido-base característica, sin embargo, el proceso de endurecimiento es complementado por una reacción de polimerización, pudiendo ésta ser del tipo fotopolimerizable, autopolimerizable o dual. El polvo mantiene su fórmula convencional, pero se incorporan sustancias que además iniciarán la polimerización. Si se trata de ionómero de vidrio modificado con resina fotopolimerizable, el iniciador será del tipo dicetona-amina, si por el contrario tenemos ionómeros modificados con resina autopolimerizable, los iniciadores serán peróxidos. El líquido se basa en una

solución de ácidos policarboxílicos con grupos vinílicos adicionales, moléculas hidrófilas y agua (51).

Las instrucciones de uso suelen recomendar la utilización previa de APA, pero un estudio reciente de Sauro y cols. ha concluido que el acondicionamiento de la dentina con APA antes de la aplicación de CIV modificado con resina (CIVMR) no induce un efecto sustancial sobre la resistencia de la unión después del almacenamiento a corto plazo. Además, su uso puede aumentar el riesgo de degradación del colágeno en la interfaz de unión tras el envejecimiento prolongado. Los CIVMR modernos aplicados sin pretratamiento de dentina pueden tener una mayor sinergia terapéutica con la saliva durante el termociclado, lo que mejoraría incluso la remineralización y la protección de la interfaz de unión (53).

1.6.1.4 *Propiedades del ionómero:*

- El cemento se adhiere químicamente a la estructura dentaria a través de la formación de puentes de hidrogeno entre los grupos carboxílicos del ácido e iones Ca^{+2} presentes en dentina y esmalte. En resumen, se produce una reacción de quelación con el calcio presente en el tejido (54).
- Se observa un mínimo cambio dimensional durante el fraguado, de esta forma se evitan las tensiones en la interfase diente-material.
- La variación dimensional térmica es similar a la que ocurre en la estructura dentaria, lo cual redundará igualmente en la ausencia de tensiones en la interfase diente-material.
- Se trata de un material biocompatible, a pesar de contener ácidos.
- Las propiedades ópticas de los cementos modificados con metal no son buenas, son estéticamente deficientes, no así los modificados con resinas,

que presentan importantes mejoras en este aspecto, aunque siguen lejos de los composites.

- Es capaz de liberar fluoruros y esto lo dota de un gran potencial antibacteriano, cariostático y remineralizante (55).

En este apartado, cabe destacar el estudio ya clásico, llevado a cabo por ten Cate y cols. en 1995 (56), donde los especímenes contenían una restauración cercana a una lesión que reproducía una caries dentinaria. Las muestras, con amalgama y composite como controles y otras con CIV, se colocaron de forma contralateral en las superficies bucales de las prótesis parciales removibles y fueron llevadas por voluntarios durante un período experimental de 12 semanas, después de lo cual las muestras se seccionaron y analizaron mediante microrradiografía. Todas las muestras con restauraciones de CIV mostraron hipermineralización en el tejido que bordeaba el relleno y en la pared de la preparación que había estado en contacto con la restauración. Las lesiones (similares a la caries) se remineralizaron, incluso en condiciones de formación de placa madura. En contraste, los especímenes con amalgamas o restauraciones de resina compuesta mostraron una desmineralización más extensa (57).

Podemos concluir que la capacidad de los CIV para proporcionar una CH poco profunda pero uniforme, se considera conveniente en términos de rendimiento de unión inmediata, así como de durabilidad a largo plazo. Esto se debe a la leve acidez de estos materiales que sólo desmineralizan los espacios extrafibrilares alrededor de las fibrillas colágenas (9).

A pesar de todas las bondades del material que hemos mencionado, se requieren mejoras adicionales en las propiedades mecánicas y ópticas de los materiales basados en CIV actuales, antes de que puedan usarse para la restauración de dientes posteriores en clases extensas tipo I y II como único material. Además, el uso de materiales basados en CIV puede no representar el enfoque terapéutico

“ideal” para remineralizar biomiméticamente la interfaz resina-dentina. Aunque los que están específicamente desarrollados para la remineralización de la dentina tienen la capacidad de inducir el crecimiento de cristales dentro de la microporosidad en la interfaz. Kim y cols. en 2010 (58), demostraron que los materiales basados en CIV no lograron remineralizar completamente la dentina empobrecida en apatita debido a la falta de nucleación de la nueva apatita incluso cuando se emplearon análogos biomiméticos remineralizantes (APA y polivinilfosfónico, APV) durante el período de envejecimiento. Su conclusión fue que la concentración de minerales por sí sola no es un punto final suficiente para evaluar el éxito de las estrategias de remineralización contemporáneas.

Por lo tanto, se deben desarrollar otros materiales innovadores basados en resinas liberadoras de iones para aplicaciones dentales en combinación con análogos biomiméticos, a fin de lograr una estrategia de unión terapéutica “definitiva” capaz de lograr la remineralización. Así como un enfoque más confiable para restablecer los valores del módulo elástico del colágeno mineralizado dentro de la CH. El objetivo final no es otro que lograr obtener interfases resina-dentina estables en el tiempo (9).

1.6.2 Materiales basados en pretratamientos “bioactivos” de la dentina.

La filosofía de tratamiento odontológico actual, basada en la “mínima invasión”, ha propiciado el desarrollo de tratamientos restauradores atraumáticos, basados en la remoción selectiva de caries y preparaciones cavitarias mínimamente invasivas. Esta tendencia se la debemos en parte a los estudios de Bjørndal y cols. (59) , que en 2010 publicaron protocolos basados en la remoción cuidadosa de la DI que forma la periferia y la base de la cavidad; sin embargo, en el caso de lesiones profundas, La DI, blanda y húmeda, a menudo se dejaba en esta última parte de la cavidad para evitar la exposición de la pulpa. Posteriormente, la base de la cavidad se revestía primero con un medicamento a base de hidróxido de calcio y se restauraraba temporalmente. Después de aproximadamente 6-12 meses, los

materiales restauradores temporales podían retirarse y generalmente se encontraba un tejido de dentina suficiente para realizar una restauración adecuada y definitiva de resina compuesta.

Sin embargo, el éxito de esta técnica no se basaba en la remineralización “in situ” adecuada de la DAC que queda dentro de la cavidad durante la excavación selectiva, sino que se debe a la liberación de los factores de crecimiento de la dentina, gracias al hidróxido de calcio que desencadena una fuerte reacción por parte de la pulpa. El resultado final es la formación de dentina reparadora o terciaria a lo largo de las paredes de la cámara pulpar, cerca de la lesión, en definitiva, un proceso de hipermineralización debajo de la desmineralización de la lesión cariosa (DE básicamente) que impide la invasión de bacterias y la progresión de la lesión hacia la pulpa.

Actualmente, tenemos materiales disponibles para la abrasión por aire que facilitan todo el proceso mencionado, desde la preparación cavitaria hasta la remineralización, esta vez “in situ” de la interfaz adhesiva. Comercialmente tenemos disponible el vidrio bioactivo (VB) 45S5 (Bioglass® o Syc®. Londres, Reino Unido) o el vidrio bioactivo experimental dopado con APA (VB-APA) utilizado en un dispositivo de abrasión por aire (Aquacare®, Velopex International, Reino Unido). Con este material se puede producir una capa “bioactiva” con propiedades terapéuticas (60), que puede preservar la integridad de la interfaz adherida a la dentina y la resistencia de la unión creada al utilizar adhesivos autograbantes o materiales a base de CIV (61).

El VB-45S5, puede reaccionar con los fluidos corporales, produciendo precipitación de HA y remineralización de la dentina y el esmalte. El VB supone una alternativa a los abrasivos a base de óxido de alúmina, y está introducido en la odontología restauradora contemporánea mediante sistemas de abrasión por aire. De hecho, la capacidad del VB para crear preparaciones de cavidad con una pérdida mínima de tejidos sanos se atribuye a sus propiedades mecánicas únicas: i) Módulo de Young:

35Gpa; ii) Dureza Vickers: 458VHN. Estos valores son significativamente más bajos que los de la alúmina (380Gpa y 2,300VHN), pero con un módulo de Young similar a la dentina sana y una dureza Vickers similar al esmalte. La preparación de cavidades ultraconservadoras realizada con VB se caracteriza por ángulos de línea internos redondeados que pueden minimizar la tensión generada por la contracción de la resina compuesta a lo largo de la interfaz de unión (62). Además, las partículas de VB obliteran los túbulos dentinarios y esto podría evitar la difusión de agua a través de estos a la interfaz unida a resina, este hecho se traduciría en una reducción importante de la absorción de agua por parte de la CH.

En resumen, podemos concluir que este enfoque mejora la durabilidad de la dentina unida a adhesivos autograbantes o materiales a base de CIV cuando se usa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (la abrasión por aire con VB/10% de APA antes de la aplicación de sistemas autograbantes). Además, el éxito de los procedimientos VB/APA se debe probablemente a la liberación lenta de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} de VB-45S5 junto con APA, que no es más que un polianión secuestrante de Ca^{2+} que contribuye a la formación y mantenimiento del fosfato de calcio amorfo pudiendo infiltrar el colágeno en estado líquido y remineralizar la interfaz resina-dentina (63).

1.6.3 Materiales experimentales adhesivos liberadores de iones.

Entre las demandas clínicas más importantes para afrontar la nueva era adhesiva, podríamos destacar el desarrollo de adhesivos fotopolimerizables con propiedades de sorción/solubilidad de agua “controladas”, para que puedan tolerar mejor la humedad dentinaria y absorber una cantidad precisa de fluidos orales (por ejemplo, fluido dentinal y saliva). Además, deberían permitir la liberación de iones particulares como Ca^{2+} y PO_4^{3-} que como hemos mencionado pueden actuar como precursores de minerales similares a la apatita (bioactividad) y reemplazar el agua residual en la CH (micro y nanoporosidades). La captación de minerales y la formación de apatita

pueden conducir a la remineralización del colágeno de dentina unido a resina, protegiendo las fibrillas de la degradación enzimática (63).

Varios sistemas experimentales de adhesivos liberadores de iones dopados con microrellenos bioactivos como VB-45S5 y VB policarboxilado modificado con zinc han sido formulados para lograr estos objetivos. Los resultados mostraron que estos sistemas adhesivos “basados en resinas híbridas” podrían inducir un aumento significativo de las propiedades mecánicas (nano-elasticidad y nano-dureza), a lo largo de las áreas empobrecidas en minerales dentro de la interfaz resina-dentina; así como importantes reducciones de la micropermeabilidad de la interfase, después del almacenamiento prolongado en saliva artificial (STP) (64).

Estos adhesivos experimentales de liberación de iones se formularon específicamente como sistemas de liberación lenta que se degradan durante el almacenamiento en STP, para proporcionar el suministro de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} dentro de la interfaz (65). Por esta razón, estos adhesivos experimentales con liberación de iones mostraron poca reducción (significancia estadística) en la resistencia de unión después del almacenamiento en STP durante 3 meses. Sin embargo, cuando los autores realizaron el análisis fractográfico y MEB, las fallas más frecuentes fueron las fallas cohesivas en la resina, y cuando se expusieron las superficies de la dentina, se demostró que estaban cubiertas por una matriz de resina-dentina mineralizada, similar a los casos de interfases creadas con CIV (64).

Quedó patente entonces que no se podía tener todo en un material, bioactividad y gran resistencia intrínseca a la vez, de hecho, la resistencia a la tracción fue similar a la mostrada por los materiales a base de CIV que generalmente nos dan fuerzas de unión a la tracción de alrededor de 5Mpa y también sufren muchas fracturas cohesivas (66).

Por otro lado, para aumentar la estabilidad del adhesivo experimental se propuso la adición de un primer acondicionador separado, un monómero funcional carboxílico

y aparte un adhesivo dopado de VB-45S5. Los buenos resultados se atribuyeron a la separación del primer que podría haber infiltrado y protegido mejor las fibrillas de colágeno dentro de la CH, como ocurre generalmente en los procedimientos de unión de múltiples pasos. Además, los primers que contienen monómeros funcionales específicos pueden ser capaces de unir la HA restante alrededor de las fibrillas de colágeno, pero más importante, en la parte inferior de la CH donde los procesos de degradación parecen comenzar (67).

Incluso podemos ser más ambiciosos en el futuro, y dotar a estos adhesivos de capacidad antibacteriana, incorporando iones como el zinc, que no interfieren en la adhesión, y que además inhiben MMPs, aumentando la estabilidad y longevidad de la CH (68).

Otra variante para intentar la *remineralización biomimética* se basa en una investigación publicada por Qi y cols. en 2012 (69), donde demostraron que un compuesto fluido a base de resina experimental, que contenía silicatos de calcio a base de cemento Portland y polianiones biomiméticos como APA y APVP, puede “rellenar” lentamente cualquier espacio lleno de agua residual con cristales de apatita. Estos cristales desplazan el agua residual libre e inactivan todas las proteasas “fossilizando” las enzimas colágenas.

El cemento Portland, y sistemas que contienen fosfato, utilizados en presencia de APA como estabilizador para PCA y APVP como análogos biomiméticos de las proteínas de la matriz de unión a colágeno, pueden inducir la remineralización biomimética total de la CH y aumentar la durabilidad de dichos enlaces resina-dentina (69). Es importante tener en cuenta que los cementos puros Portland o los silicatos como BIO no pueden inducir la remineralización biomimética de la dentina por sí solos y restablecer las propiedades biomecánicas funcionales debido a su alta alcalinidad (pH 12), lo que provoca una degradación cáustica de las fibrillas de colágeno que luego son reemplazadas principalmente por carbonatos de calcio o por cristales similares a la apatita(70). Sin embargo, estos tipos de cementos han

encontrado importantes aplicaciones en odontología debido a su capacidad para inducir la precipitación de minerales y la formación de dentina reparadora cuando se utilizan como materiales de recubrimiento pulpar (71).

Sauro y cols. en 2.015 (39) , afirmaron que el uso de primers biomiméticos que contenían trimetafosfato (TMP) y ácido poliaspártico (PAPA), junto con adhesivos liberadores de iones, inducían la remineralización del colágeno. Esta remineralización “de dentro-afuera” era opuesta al método “de fuera-adentro” recién comentado, en el que sólo se depositan minerales en la superficie de la dentina húmeda (MTA y BIO). En el estudio se pusieron de manifiesto algunas áreas con menor remineralización, que estaban completamente llenas de agua, y que se terminaron de remineralizar completamente obteniendo valores de rigidez que no fueron significativamente diferentes de la dentina mineralizada subyacente. Estas muestras remineralizadas, generadas con la resina experimental liberadora de iones y una imprimación que contenía TMP y PAPA, no mostraron una reducción significativa de los valores de μ TBS durante 90 días de almacenamiento en STP. Además, en el análisis fractográfico, estos especímenes presentaban una superficie sin fibrillas de colágeno expuestas, ya que estaban claramente cubiertas por la deposición de nanocristales tanto en la dentina intertubular como en la intratubular (39).

1.7 Conclusión de la introducción e importancia clínica.

La dentina es un tejido celular vital que contiene los procesos odontoblásticos, dentina y pulpa deben considerarse como una unidad histofuncional. El desequilibrio en el biofilm desemboca en la enfermedad de la caries, se trata de un asalto a este tejido vital que aún mantiene la capacidad de defenderse. En 1967 Massler (27), extrajo el conocimiento científico actual sobre este asunto, incluida en la descripción de su propia investigación realizada durante un período de 11 años con más de 800 dientes humanos. Su sensación de frustración ante algunos de sus colegas queda patente en esta frase:

“Es algo perturbador para el profesor clínico de orientación biológica, presenciar la atención demasiado enfocada de algunos dentistas en las fases operativas y restaurativas de la odontología, la perforación y el llenado de los dientes, mientras olvidan el proceso subyacente (cariología)”.

Una combinación de reacciones de defensa y degenerativas caracteriza la lesión de caries que afecta al órgano dentino-pulpar. La contribución particular de Massler (27) fue señalar lo esencial, que es diferenciar las lesiones activas de las detenidas si se quiere dar un sentido a las reacciones biológicas. A partir de esto, sigue una gestión lógica: buscar convertir una lesión activa en una lesión inactiva o detenida, ayudando así a los procesos de defensa y curación de la dentina y la pulpa antes de intentar los procedimientos de restauración.

El Informe Mundial de Salud Oral de 2003 de la OMS, identificó la restauración de defectos dentales y/o caries con materiales artificiales (amalgama, cerámica, composite) como un problema mundial continuo y un consumo importante de recursos (72). Actualmente sigue sin haber un material restaurador adhesivo capaz de remineralizar la CH y restaurar completamente el módulo de elasticidad de las estructuras de colágeno dental subyacentes. Las cuales, como hemos visto, están empobrecidas en minerales dentro de la interfaz unida a resina, pero podrían ser susceptibles a la formación de apatita biomimética a nivel del colágeno intrafibrilar y extrafibrilar. Por lo tanto, el primer concepto importante a considerar en la odontología mínimamente invasiva es que los materiales y técnicas de restauración disponibles en la actualidad, no son capaces de remineralizar biomiméticamente y proteger inmediatamente el órgano dentino-pulpar; debido a que las fibrillas de colágeno desmineralizadas presentes en la DAC quedan desprotegidas en un ambiente rico en agua (si nos ceñimos a la mayoría de los sistemas adhesivos comercializados).

Concluyendo, es hora de que la investigación dental y la industria cooperen más plenamente en el desarrollo de materiales con una longevidad clínica mejorada, que ayuden o favorezcan la reparación del tejido biológico y que además puedan usarse fácilmente en la práctica dental. En lugar de esto, se ha intentado mejorar la formulación de sistemas adhesivos “pasivos” que pueden aumentar el riesgo de efectos toxicológicos inducidos por la elución de componentes contenidos en los materiales a base de resina fotocurable (73).

2. Objetivos, diseño del estudio e hipótesis nula.

2. OBJETIVOS, DISEÑO DEL ESTUDIO E HIPÓTESIS NULA.

2.1 Objetivos.

Los objetivos específicos de este proyecto de tesis fueron:

1. Evaluar la estabilidad adhesiva en el tiempo de un adhesivo experimental (EXP), frente a otros sistemas comerciales. El material EXP contenía bioglass dopado con fluoruro junto a preparadores biomiméticos, y fue aplicado en modo SE y ER.
2. Poner de manifiesto la capacidad remineralizante del adhesivo EXP sobre DAC “natural”.
3. Evaluar el comportamiento remineralizante del adhesivo EXP sobre DAC “artificial”, comparado al de otros sistemas comercializados.

2.2 Diseño del estudio.

El estudio “in vitro” se dividió en dos partes debido a la diferencia en la obtención de la muestra de DAC:

1ª Parte:

La obtención de DAC se realizó a través de una excavación manual selectiva de caries natural, se utilizaron molares humanos con lesiones cariosas profundas que no llegaban a pulpa, y se realizó la excavación selectiva de caries utilizando una metodología químico-mecánica (Carisolv®).

Los dientes se dividieron a partes iguales en cinco grupos.

- 2 grupos con el adhesivo EXP a testar:
 - Modo SE (EXP-SE).
 - Modo ER (EXP-ER).
- 3 grupos controles, aplicados según las instrucciones del fabricante:

- CIVMR (Cemento de ionómero de vidrio modificado con resina, RIVA LC[®], SDI, Victoria, Australia).
- OPT (Optibond FL[®], KERR, Bioggio, Suiza).
- AU (Adhesivo universal, Prime&Bond Active[®], Dentsply Sirona, Konstanz, Alemania), aplicado en modo SE (AU-SE).

Los 4 materiales se sometieron a diferentes pruebas a tiempo 0 (T0) y a 1 año (T1): μ TBM, microdureza, microanálisis MEB-EDX y microscopía confocal. Además, se seleccionaron cinco muestras representativas de cada grupo, sometidas previamente a μ TBM, y se realizó el análisis fractográfico mediante MEB.

2ª Parte:

La obtención de la DAC se hizo de manera artificial. Se crearon tres tipos de lesiones cariosas artificiales siguiendo diferentes protocolos validados (74–76):

(D1) Lesiones superficiales inducidas químicamente. Éstas se crearon almacenando las muestras en 5l de una solución desmineralizadora (pH 5.3, 37 °C) que contiene ácido acético 50 mM, $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ mM, KH_2PO_4 mM y metilhidroxidifosfonato 6 mM durante 14 días.

(D2) Lesiones profundas inducidas químicamente. Éstas se crearon mediante el almacenamiento de las muestras en la misma solución de ácido acético durante 28 días.

(D3) Lesiones profundas inducidas por bacterias.

Los materiales elegidos fueron el EXP a modo autograbante (EXP-SE), frente a 3 controles comerciales aplicados según las instrucciones del fabricante.

- CIVMR (RIVA LC[®], SDI, Victoria, Australia).
- BIO (Biodentine[®], Septodont, Niederkassel, Alemania).
- MTA (Pro Root MTA[®], Dentsply Sirona, Ballaigues, Suiza).

La pérdida de minerales se midió en la línea de base mediante microrradiografía transversal y se determinó la microdureza de la superficie también de la línea de base. A los 3 meses realizamos de nuevo la microrradiografía transversal, para valorar la ganancia de minerales, y microdureza. También se seleccionaron tres muestras representativas de cada grupo, y se analizaron mediante microscopía electrónica transversal (MET) y microscopía confocal.

2.2.1 Breve descripción de las técnicas analíticas utilizadas.

2.2.1.1 *Ensayo de microtensión (μ TBM).*

La fuerza de adhesión se mide típicamente en tracción, como prueba de microtracción (μ TBS), para evaluar la resistencia de unión de los tejidos dentales duros. Esta prueba fue introducida en 1994 por Sano y cols. (77), quienes plantearon que la resistencia de unión a la tracción era dependiente del área de la superficie adherida, de manera que pequeñas áreas de superficie se asociaban con altas resistencias adhesivas ($<1\text{mm}^2$), y por el contrario, grandes áreas de superficie mostraban baja resistencia adhesiva. Éste fenómeno, *a priori* paradójico, se explica fácilmente por la presencia de defectos o bien por la concentración de esfuerzos en la interfase o en el sustrato.

2.2.1.2 *Microscopía electrónica de barrido (MEB).*

El microscopio electrónico de barrido se utiliza para obtener imágenes de gran resolución de los rasgos ultraestructurales superficiales de los objetos, su fundamento consiste en hacer interaccionar un haz primario de electrones sobre un área del objeto que se pretende estudiar. El haz debe ser muy fino, intenso y estable, y da lugar a diversas señales que serán recogidas por diferentes detectores que nos darán una información morfológica estructural y microanalítica según el detector que se haya utilizado o interese. Las muestras para ser observadas mediante MEB deben estar bien secas y además, si no son conductoras, deberán ser recubiertas con un material conductor, que suele ser oro-paladio o grafito (78).

2.2.1.3 Microanálisis MEB-EDX.

Se trata de un complemento del MEB, implementado en la mayoría de estos microscopios, por el enorme valor que añade al estudio microscópico de los materiales. Supone básicamente, y entre otras, la posibilidad de recorrer en el momento de la observación, con el cursor guiado por el ratón, la imagen obtenida en el monitor de un microscopio de barrido, y señalar con un clic, sobre esta imagen, puntos o zonas de interés, obteniendo de forma prácticamente inmediata y precisa la composición química elemental del material en esos puntos, tanto cualitativa como cuantitativa, a nivel superficial (hasta una profundidad del orden de la micra, dependiendo de la densidad del material), y con una resolución espacial del orden también de una micra. Un software, generalmente muy completo de tratamiento de la señal, que acompaña a estos equipos de microanálisis, permite normalmente un amplio abanico de posibilidades en la obtención de información composicional sobre el material estudiado (78).

2.2.1.4 Microscopía confocal.

La característica principal de la microscopía confocal es que recoge y detecta la luz emitida por moléculas fluorescentes, situadas en un mismo plano del espacio tridimensional. Esto es posible porque la fuente de iluminación utilizada es láser. Esta luz monocroma ilumina las muestras específicamente con una intensidad muy elevada y estable y permite conseguir soluciones microscópicas subcelulares.

Por otra parte, en los microscopios confocales existe una pieza llamada “diafragma de detección confocal” o “*pinhole*”, que no es más que un pequeño orificio en el filtro detector de la luz, que impide el paso de aquella procedente de planos de la muestra desenfocados. Así, sólo obtenemos la información de la región enfocada, denominada “plano de imagen primario” o “plano focal” descartando el resto. Como resultado final se logran imágenes de mucha mejor calidad, pudiéndose realizar cortes virtuales de las muestras analizadas (79).

2.2.1.5 Microdureza.

El ensayo de dureza o también conocido como Vickers por su autor, es una prueba de dureza por penetración, en la cual se usa una máquina calibrada para aplicar una carga por medio de un “indentador” piramidal de diamante sobre la superficie de un material. Con este ensayo obtenemos una huella piramidal de base cuadrada y el valor final lo obtenemos tras medir los extremos después de terminar la carga. Nosotros usamos un microdurómetro Vickers (HMV, Shimadzu, Kyoto, Japón) con una carga de 1 Newton (100 g) aplicada durante 15 segundos.

2.2.1.6 Microrradiografía Transversal (MRT).

La técnica microrradiográfica se basa en obtener por medio de los rayos X una radiografía de un material que, al ser observada por medio de un microscopio óptico, nos permite conocer detalles morfológicos del material. Si comparamos entre microrradiografías obtenidas, con rayos X de diferente longitud de onda, podemos averiguar la existencia de un elemento, así como su distribución topográfica o su concentración (80) .

2.2.1.7 Microscopía electrónica de transmisión (MET).

La técnica de microscopía electrónica de transmisión se ocupa de la información que tienen los electrones que traspasan una muestra sólida sobre la que se ha hecho incidir un haz electrónico coherente y a gran velocidad. La heterogénea distribución de densidad electrónica presente en un material, provoca en la radiación transmitida la formación de imágenes de interferencia, que adecuadamente interpretadas, revelan las características morfológicas y estructurales de los materiales (81).

2.3 Hipótesis nula.

Se basó en que no existe diferencia en la fuerza adhesiva y capacidad remineralizante entre sistemas de uso comercial y el adhesivo experimental, que contiene bioglass dopado con fluoruro y preparadores biomiméticos, cuando se emplean para restaurar DAC.

3. Material y método.

3. MATERIAL Y MÉTODO.

3.1. Búsqueda bibliográfica.

Para comenzar cualquier investigación, se necesita una búsqueda bibliográfica exhaustiva que lleve a conocer la situación actual que rodea la hipótesis que se quiere investigar. Tuve la suerte de que la codirección de este proyecto de tesis doctoral estuvo a cargo del Dr. Salvatore Sauro, una autoridad científica mundialmente reconocida en el campo de los biomateriales y más concretamente, de los bioactivos. EL Dr. Sauro ha publicado numerosos artículos científicos y pude disponer rápidamente de ellos para poder diseñar el futuro proyecto de investigación.

También se realizó una búsqueda bibliográfica electrónica, usando PubMed, Google Académico, Data Base y la biblioteca de la Universidad de Valencia.

Utilizamos la siguiente combinación de palabras clave, sin excluir el año de publicación: *“dentin adhesion”, “microtensile bond strength”, “caries affected dentin”, “review”, “biomimetic remineralization bottom-up”, “remineralization top-down”, “microtensile test”, “surface dentin conditioning methods”, “microhardness”, “simulated caries lesion dentin”, “transverse microradiography microscopy”, “scanning electron microscope”, “confocal microscopy”, “bonded restoration on caries affected dentin”, “water storage”, “bond dentin degradation”*.

Se tuvieron en cuenta como criterios de inclusión: textos en inglés/español, artículos científicos originales y de revisión bibliográfica, así como tesis doctorales publicadas que tuvieran relación con el tema.

Se procesaron los PDF de los artículos y tesis doctorales obtenidas con el programa Mendeley®, una plataforma de almacenaje y lectura que facilita el orden y estilo de cita, nosotros elegimos para este proyecto el protocolo de *“Vancouver”*.

Tras un estudio profundo del tema a tratar, diseñamos la metodología y decidimos dividir el estudio en dos partes bien diferenciadas tal y como hemos mencionado anteriormente. La primera parte se desarrolló íntegramente en la Universidad de Valencia (Fig. 4), la segunda parte se desarrolló en colaboración con la Universidad de Berlín.

3.2 DAC “natural”.

3.2.1 Diseño del estudio.



*Fig. 4. Laboratorio de investigación experimental.
Clínica Odontológica Universitaria. Universidad de Valencia.*

El proyecto de tesis doctoral con el número de procedimiento H1537947515352, fue aprobado por el comité ético de investigación en humanos, de la comisión de ética en investigación experimental de la Universidad de Valencia. Resolvieron que se respetan los principios fundamentales establecidos en la declaración de Helsinki, en el convenio del consejo de Europa relativo a los derechos humanos. También cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética (ANEXO 2).

Se recolectaron cincuenta molares humanos con lesiones cariosas profundas, principalmente de las consultas de odontología situadas en dos centros de salud de atención primaria, situados en Murcia capital (Centro de salud de San Andrés y Centro de salud Infante Juan Manuel), así como de mi consulta privada (Clínica Dental Ferrando). Todos los dientes se recolectaron en duquesitas con una

solución fijadora de Timol al 2% y se almacenaron refrigeradas a 4°C antes del procesamiento.

3.2.2 Preparación de los especímenes.

3.2.2.1 *Material y equipamiento (orden alfabético).*

- Abrazadera Sin Fin 20-32 Mm Asfa S-Acero W1 Mikalor 50 piezas.
- Aceite de inmersión tipo F para microscopía de fluorescencia Olympus. (Tokio, Japón).
- Ácido ortofosfórico De Trey conditioner, 36% (Dentsply Sirona. Konstanz. Alemania).
- Ácido fluorhídrico al 9,6 % (Pulpdent. Massachusetts, EE.UU).
- Adhesivo Experimental.
- Adhesivo Universal Prime & Bond Active, AU (Dentsply Sirona. Konstanz. Alemania).
- Agua destilada.
- Aplicadores microbrush. (Microbrush International).
- Activador de cianocrilato Cofan (Ciudad Real. España).
- Baño ultrasonidos 4820 Tecnylab (Valencia. España).
- Bloques utilizados de cerámica para CEREC (Dentsply Sirona. Bensheim. Alemania).
- Calibre digital Goocher.
- Cianocrilato (Loctite-Superglue 3M).
- Columna de presión pulpar. Laboratorio U.V.
- Composite Bulk fill SDR (Dentsply Sirona. Konstanz. Alemania).
- Disco de pulido granulometría 1.200 Struers (Leipzig. Alemania).
- Disco diamantado H327-190PM Horico (Berlin. Alemania).

- Disco de corte de diamante MOD13 Intensiv (Suiza).
- Esmalte de uñas Maybeline (New York. EEUU).
- Estereomicroscopio (SMZ161-BLED, Motic. Hong Kong. China).
- Fresa de “bola” diamantada 801-012 (Intensiv. Suiza).
- Fresa de “llama” 864-012 (Intensiv. Suiza).
- Guía para suero V14 macrogoteo C/ruedita Mcm.
- Heliobond (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein).
- Incubadora automática Wiltec (China).
- Kit de instrumental de excavación original del sistema Carisolv® (Medi Team. Suecia).
- Lámpara de polimerizar Smartlite (Dentsply Sirona. Konstanz. Alemania).
- Manguera de goma- tubos de latex natural 1/3/5M 3050.
- Máquina de corte Struers Minitom (Leipzig. Alemania).
- Máquina de tracción LMT 100 Model: UU-K20. LAM Technologies (Italia)
- Microscopio electrónico de barrido Hitachi S-4800 MEB (Tokio. Japón).
- Microscopio confocal MIC-04 OLYMPUS FV1000 (Tokio. Japón).
- Microdurómetro Vickers HMV, Shimadzu (Kyoto. Japón).
- Optibond FL. OPT (Kerr. Bioggio. Suiza).
- Pera de succión de goma.
- Pellets de Algodón Roeko. Coltene (Langenau. Alemania).
- Pieza de mano KAVO E10C Expertmatic (Kavo, Biberachan der Riss. Alemania).
- Pinza dental.KDM.
- Portas específicos para máquina de ensayo de tracción LMT100.
- Pulidora Labopol Struers. (Copenhagen. Dinamarca).
- RIVA LC, CIVMR (SDI. Victoria. Australia).

- Fluoresceína 1% Sigma-Aldrich (St. Louis. EE.UU).
- Sistema Carisolv (Medi Team. Suecia).
- Software FV10-ASW 4.2. Olympus. (Tokio. Japón).
- Solución salina tamponada con fosfato (STP).
- Turbina KAVO S619L LUX Smarttorque (Kavo, Biberach an der Riss. Alemania).
- Vibrador de amalgama Silamat (Ivoclar-Vivadent. Schaan. Liechtenstein.)

3.2.2.2 *Proceso.*

En primer lugar, bajo refrigeración con turbina, y una fresa de “bola diamantada” (801-012), se eliminaron los bordes de esmalte superficial circundantes a la lesión. Seguidamente, con un disco diamantado rígido (H327-190PM Horico) montado en una pieza de mano se cortaron los dientes horizontalmente hacia el ecuador radicular y se vaciaron mecánicamente de materia orgánica desde apical con una fresa larga en forma de “llama” (864-012L). Quedaron así limpios, tanto los conductos como la cámara de pulpar, para asegurar la limpieza se aplicó además ácido ortofosfórico desde apical (De Trey conditioner, 36%. Dentsply Sirona. Konstanz. Alemania) durante 1 minuto, seguido de un lavado profuso.

Antes de testar los diferentes materiales, los especímenes se montaron en un sistema similar al descrito por Pashley y cols. (82), que simula “presión pulpar positiva” a través de un circuito cerrado con una columna de agua (Fig. 6). Los especímenes se montan y se sellan en mangueras terminales de goma dura, conectadas a una columna de agua destilada, que genera una presión aproximada de 20 cm en la cámara pulpar (83–85). También podemos observar en la Fig.5 , un esquema del método de obtención de las barritas en estos especímenes con DAC, siguiendo prácticamente los mismos pasos que ya describieron Sano y cols. (86).

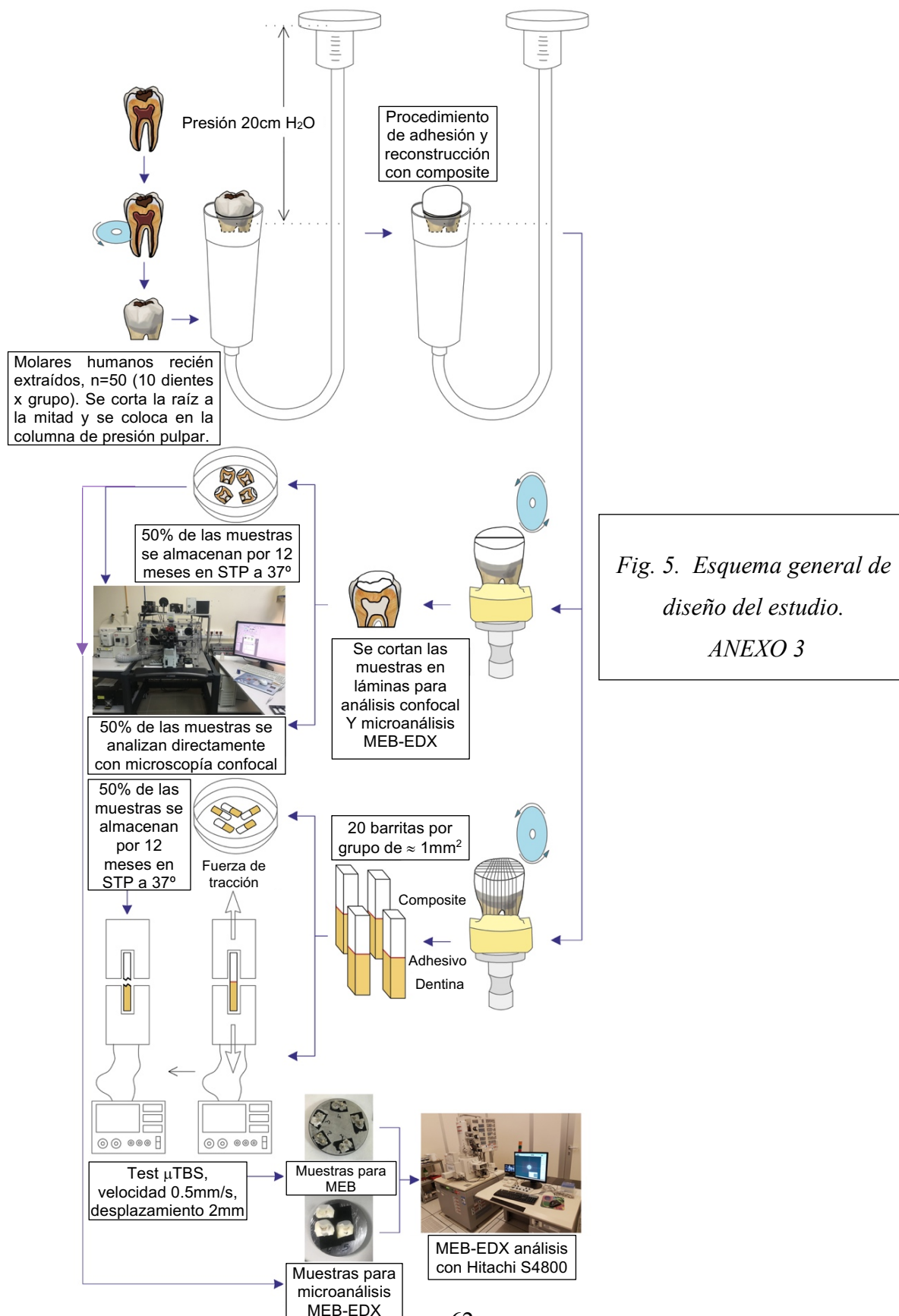




Fig. 6. “Columna de simulación de presión pulpar positiva”. Laboratorio de investigación de la Clínica Odontológica Universitaria. Universidad de Valencia

Una vez conectados los especímenes y verificado el sellado hermético del sistema, se procede a la excavación selectiva de caries utilizando el producto Carisolv® (67, 77) según las instrucciones de uso. En la Fig. 7 podemos observar una muestra montada en la columna y eliminando la DI con los instrumentos originales del sistema Carisolv®. En la Fig. 8 podemos observar dos ejemplos de antes/después tras la eliminación de la DI.



Fig. 7. Sellado hermético “presión pulpar positiva” y eliminación de la DI utilizando el sistema Carisolv®.

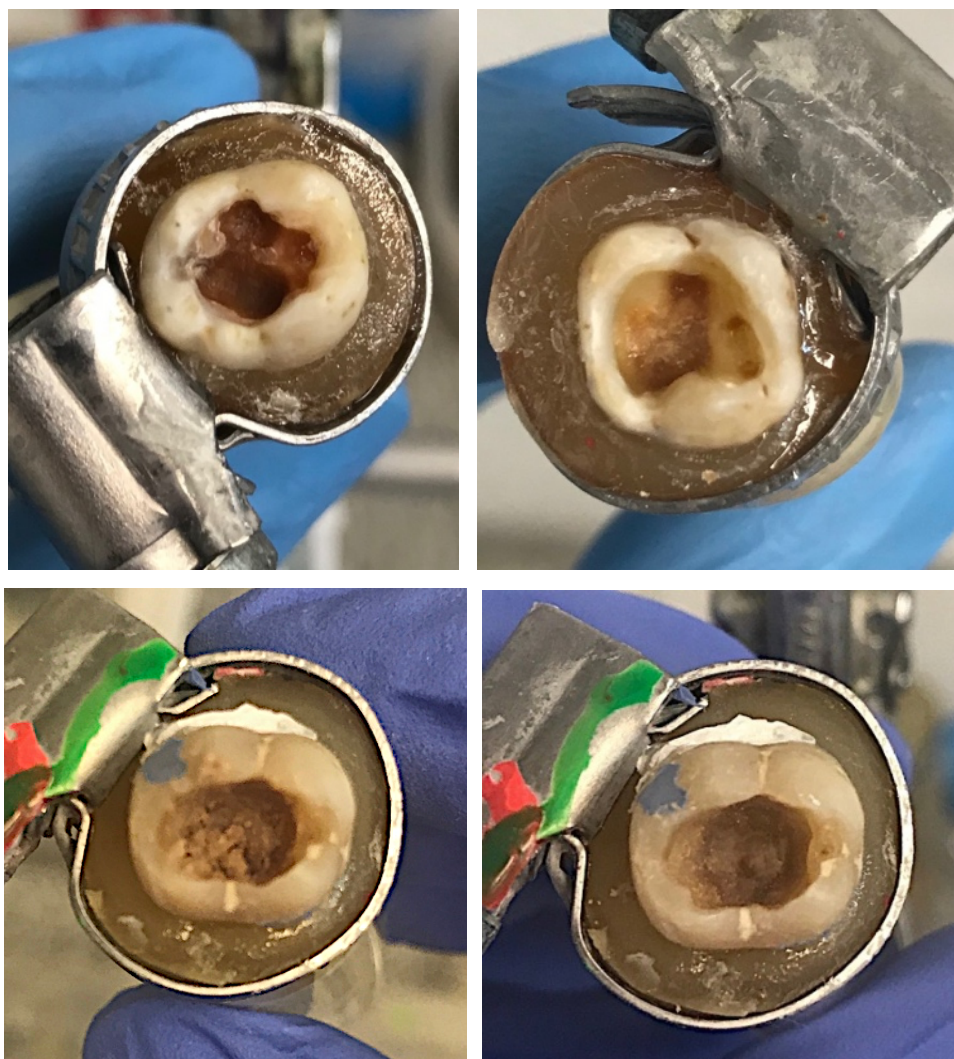


Fig. 8. En las imágenes de la derecha observamos la DI y en la izquierda apreciamos la DAC tras la excavación con CarisolvTM.

Una vez concluida la obtención de la DAC, pasamos a realizar el procedimiento adhesivo según el material e instrucciones clínicas de uso, y a sobreobturar (Fig. 9) la cavidad con un composite Bulk-fill (SDR. Dentsply Sirona. Konstanz. Alemania).



Fig. 9. Cavidad sobreobturada con SDR.

3.2.3 Materiales restauradores y adhesivo experimental.

En esta parte, los materiales restauradores controles son:

- CIVMR, (Cemento de ionómero de vidrio modificado con resina, RIVA LC, SDI, Victoria, Australia).
- OPT (Optibond FL, KERR, Bioggio. Suiza).
- AU (Adhesivo universal, Prime & Bond Active, Dentsply Sirona, Konstanz, Alemania), aplicado en modo SE (AU-SE).

El sistema que vamos a testar es un adhesivo experimental que aplicaremos en modo ER (EXP-ER) y en modo SE (EXP-SE).

Ya que todos los materiales controles se aplicaron sin variar las instrucciones de uso comerciales y por lo tanto no tiene más interés detallar el “paso a paso”, nos vamos a centrar en la composición y el manejo del adhesivo EXP con el que los vamos a comparar.

3.2.3.1 Composición del adhesivo experimental.

El adhesivo experimental consta de tres partes bien diferenciadas: un “*preparador biomimético*”, que contiene análogos biomiméticos que inducen remineralización,

un “*primer autograbante*” y un “*adhesivo*” que contiene un 50 % en volumen de bioglass dopado con fluoruro y un 50% de resinas (89).

El preparador biomimético de este adhesivo experimental contiene ácido poliacrílico (APA) y trimetafosfato (TMP).

El primer se obtuvo mezclando 20% en peso de glicerol-dimetacrilato-fosfato (GDMA-P), 10% en peso de hidroxietil-metacrilato (HEMA), 15% en peso de uretano-dimetacrilato (UDMA), 5% en peso de trietilenglicol-dimetacrilato (TEGDMA), 20% en peso de agua desionizada y 30% en peso de etanol absoluto. El pH se ajustó a 2,1 usando NaOH (42).

El adhesivo se compone en un 50% de una solución compuesta por un 30% en peso de UDMA, 25% en peso de TEGDMA, 20% en peso de GDMA-P, 17% en peso de bisfenol-A-diglicidil-dimetacrilato etoxilado (Bis-EMA), 5% en peso bisfenol-AG , diglicidil-dimetacrilato (Bis-GMA), 1% en peso de benzoato de etil 4-dimetilamina, 0.5% en peso de canforoquinona y 1.5% en peso de hexafluorofosfato de difeniliodonio (42).

El otro 50% se compone de fluoruro-bioglass (BAG-F). El vidrio bioactivo que contiene fluoruro experimental (composición nominal: 42,7% en moles de SiO₂ 26,2% en moles de CaO 26,1% en moles de Na₂O 4,0% en moles de P₂O₅ y 1% en moles de CaF₂), se preparó como describió anteriormente Tezvergil y cols. en 2017 (89). Los vidrios se molieron y finalmente se tamizaron (<30 µm), luego son incorporados a la resina para ser aplicados (relleno/resina: 50/50% en volumen). La mezcla se realiza manualmente en un tubo eppendorf justo antes de ser aplicado.

3.2.3.2 *Modo de empleo del adhesivo experimental.*

1. Preparador biomimético. Este preparador se aplica por 20 segundos y se elimina con aire.

2. Primer autograbante. Se aplica por 10 segundos, e incorpora el exceso del preparador anterior, por esta razón hay que soplar fuerte con aire, para quitar todos los excesos de agua. Después aplicamos nuevamente otra capa de primer como un adhesivo convencional y soplamos suave por 5 segundos más (Fig. 10).

3. Adhesivo bioactivo. Finalmente aplicamos la mezcla BAG-F/ resina 50%/50%, como si fuera una “resina fluida”, sin preocuparnos en absoluto por el grosor de capa. De hecho, necesitamos espesor para generar una buena distribución de iones, por eso, el aspecto visual final de la capa debe ser “blanquecino-amarillento” (Fig. 10). Finalmente polimerizamos por 30 segundos y ya se puede aplicar el composite convencional.



Fig. 10. En la foto de la derecha observamos el primer autograbante y en la de la izquierda el adhesivo bioactivo.

3.2.4 Ensayo de microtensión (μ TBM).

3.2.4.1 Preparación de los especímenes para el corte y obtención de barras.

Una vez concluido el procedimiento adhesivo de los diferentes grupos pasamos a montar los dientes en bloques residuales de cerámica CAD-CAM para CEREC[®], literalmente los adheríamos por la parte apical con resina Heliobond (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) y SDR (Dentsply Sirona, Konstanz, Alemania). Grabamos con ácido ortofosfórico al 37% (De Trey conditioner, 36%, Dentsply Sirona, Konstanz, Alemania) la parte apical del espécimen y con ácido fluorhídrico al 9,6% (Pulpdent, Massachusetts, EE.UU) el bloque CAD-CAM; de esta manera, nos aseguramos de que no se movieran nada durante el proceso de corte que se realizó con un disco de corte diamantado a 200-300 rpm en una máquina de corte Struers Minitom (Fig. 11).



Fig. 11. Máquina de corte con un espécimen montado en un bloque residual de cerámica para CEREC[®].

Dejamos 1,5 mm entre corte y corte porque tenemos que contar con el grosor del disco, así obtendremos barras de $\approx 1\text{mm}^2$ (Fig. 12).



Fig. 12. Espécimen montado en la máquina de corte donde observamos los cortes de las barritas antes de separarlas completamente.

Por último, terminamos de separar las barritas fuera de la cortadora con un disco de diamante y pieza de mano a baja revolución. La mitad de ellas las almacenaremos a 37°C en una incubadora automática con STP, para poder valorar el comportamiento adhesivo y remineralizante al año (μ TBM, MEB y microanálisis MEB-EDX).

3.2.4.2 Montaje de barritas en las portas, máquina de ensayo (μ TBS) y modos de fractura.

Las barritas se montaron en los portas de manera que la interfaz adhesiva quedara en el centro, se utiliza una gota de cianocrilato (Loctite-Superglue. 3M-ESPE) para fijar los extremos y tras el secado se procedía al ensayo de tracción en sí. En nuestro caso la máquina de ensayo utilizada es una LMT100 (Fig. 13).



Fig. 13: Máquina de ensayos μ TBS.

Los parámetros del ensayo de tracción fueron: **velocidad 0.5mm/s y un desplazamiento máximo de 2mm** (90) siguiendo el protocolo de otras tesis doctorales publicadas en la Universidad de Valencia con los mismos parámetros y maquinaria. En el siguiente ejemplo de un ensayo de tracción del material experimental (EXP-SE) a 1 año de almacenamiento en STP (Fig. 14), podemos observar el pico de fuerza en Newtons, que dividido por el área de la barra nos proporciona el valor de fuerza de adhesión en megapascals (Mpa).

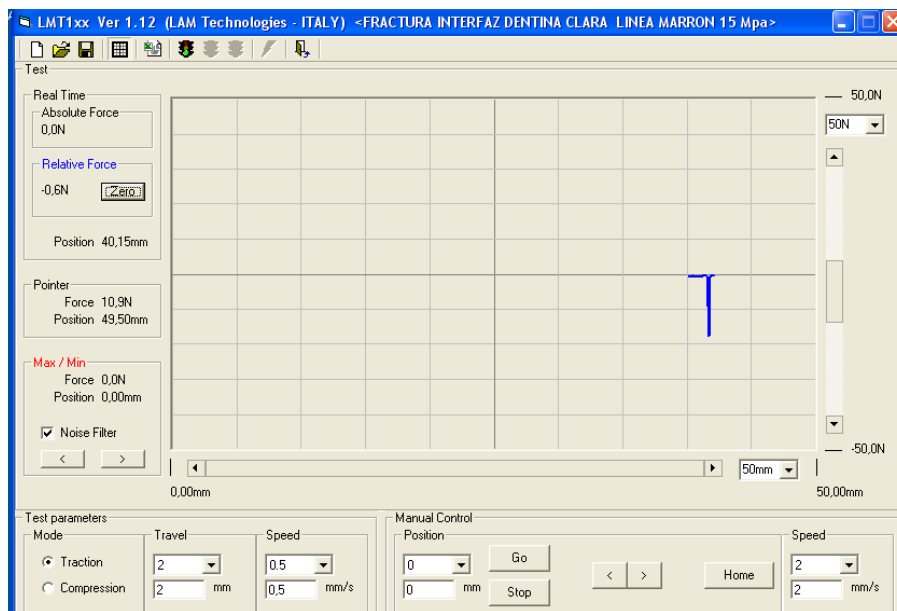


Fig. 14. Ejemplo gráfico del ensayo de tracción. El momento de la captura no coincide con el valor en Newtons que se representa.

En total completamos una media de 20 muestras por grupo a T0 y T1. Los modos de fallo fueron clasificados macroscópicamente en tres categorías: interfaz-adhesiva, cohesiva y mixta, y además se apuntó el aspecto de la dentina. En la Fig. 15 podemos ver una muestra montada en un porta tras el ensayo de tracción.



Fig. 15. Ejemplo de fractura adhesiva en un ensayo de tracción.

3.2.5 Microscopía electrónica de barrido (MEB).

La selección de las muestras para el análisis fractográfico mediante MEB, se realizó primero con un estereomicroscopio (SMZ161-BLED, Motic.Hong Kong. China) para hacer el cálculo total de los fallos. Tras este análisis se eligieron 5 barritas por cada grupo que eran representativas del modo de fallo más evidente.

Se realizó entonces el control final de verificación con MEB (Hitachi S-4800 SEM), de las 5 muestras más representativas de cada grupo (Fig. 16), y se comprobó, por ejemplo, que muchas de las fracturas clasificadas macroscópicamente como adhesivas, serían mixtas, ya que se fracturaba el material o incluso la DAC, además de la propia interfaz. En el caso de CIVMR se observó que la fractura era, en la mayoría de los casos, cohesiva o mixta, de manera que siempre quedaba una capa de material cubriendo la dentina (Fig. 17). Esto se explica debido a que el material se adhiere muy bien, pero como explicamos en la introducción, no tiene propiedades mecánicas adecuadas para el ensayo (86) .

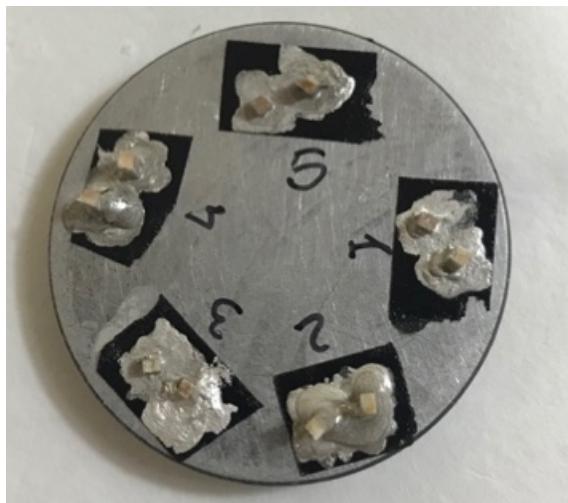


Fig. 16: Muestras de cada grupo colocadas en el porta para el microscopio electrónico ya desecadas y metalizadas con oro-paladio².

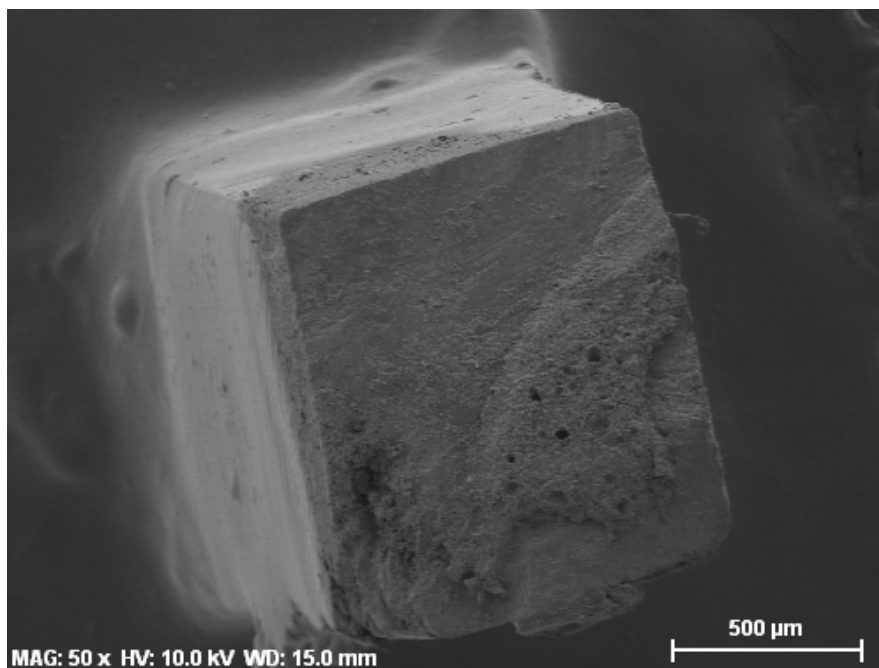


Fig. 17: Se observan un ejemplo de una muestra al MEB a 50 x.

3.2.6 Microanálisis MEB-EDX.

Adicionalmente, se prepararon dos muestras más de cada grupo y se realizaron tres mediciones a 50 μ m debajo de la interfaz, una central y dos más periféricas a T0 (n=15) y T1 (n=15). Los especímenes se obtuvieron siguiendo todo el protocolo ya descrito, primero en la columna de presión pulpar se realizaron los diferentes procedimientos adhesivos, luego se unieron a bloques CAD-CAM, pero se cortaron esta vez sólo por la mitad en 2 o 3 lonchas de 4mm de grosor con la máquina de corte Struers-Minitom. En la siguiente Fig.18 podemos ver cinco muestras montadas, una por cada grupo, preparadas para realizar el microanálisis EDX.

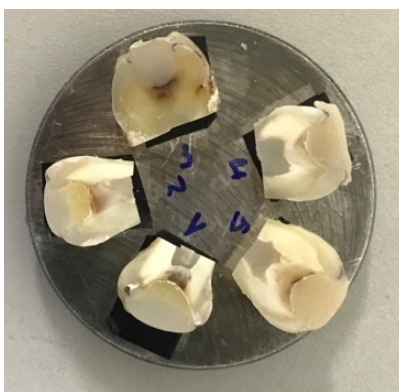


Fig. 18: muestras montadas para micoranálisis MEB-EDX.

Como ejemplo, en la composición siguiente, podemos apreciar un informe básico, generado automáticamente por el sistema de microanálisis asociado al microscopio Hitachi S-4800 SEM (Fig 19). Incluye la imagen composicional de la superficie, en la que se han hecho las determinaciones analizadas, los correspondientes espectros de emisión de rayos X, mostrando los picos de los elementos seleccionados por nosotros (P, Ca, F, Na, Si, Sr) y presentes en cada zona, así como el análisis cuantitativo porcentual de estos elementos.

La concentración atómica relativa es la variable dependiente de interés en este estudio. Lo que pretendimos evaluar en los resultados es si el peso relativo del P y Ca (indicativos de remineralización) en este conjunto de 6 minerales cambia o no de T0 a T1.

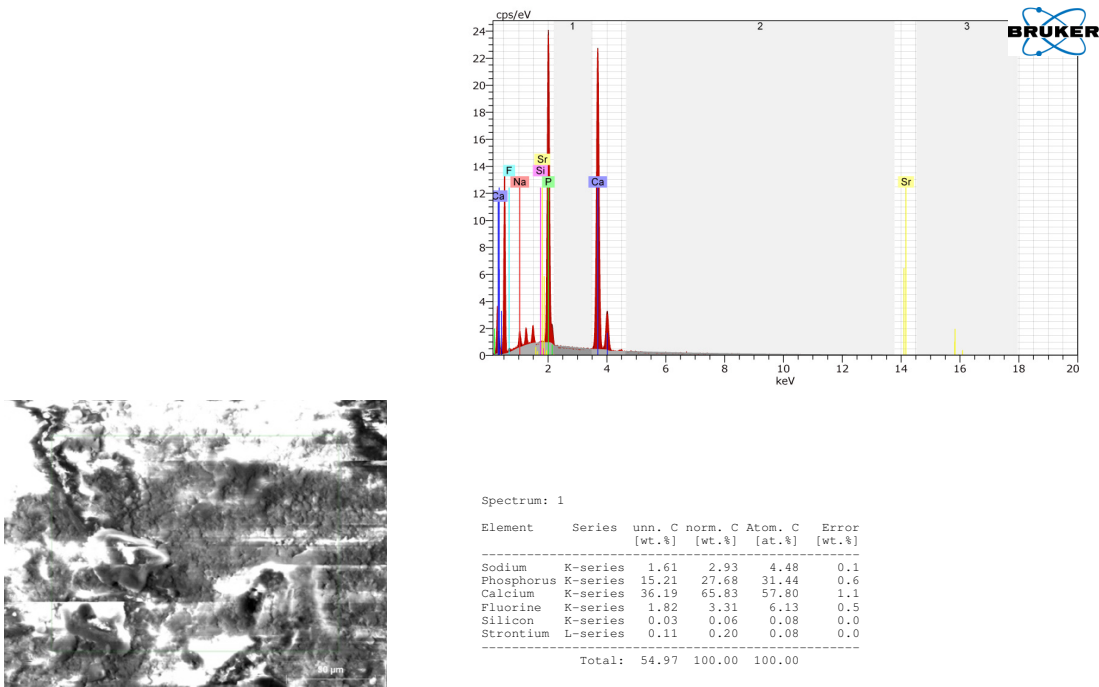


Fig. 19: ejemplo de microanálisis MEB-EDX, para el posterior análisis estadístico tendremos en cuenta la columna de % atómico.

3.2.7 Microscopía confocal.

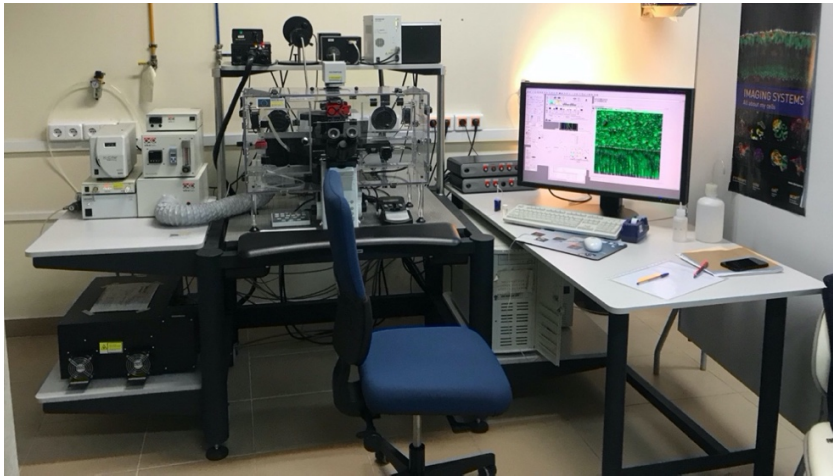


Fig. 20. Microscopio confocal MIC-04 OLYMPUS FV1000.
Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental. Universidad de Valencia.

Adicionalmente, se prepararon cinco muestras más de cada grupo, se seleccionaron dos representativas de cada uno para ser sometidas a esta prueba, se mezclaron con un 0.2% en peso de fluoresceína 1% (Sigma-Aldrich.St. Louis. EE.UU) (Fig. 21). Después de 24h, las muestras fueron tratadas en un baño de ultrasonidos Baño ultrasonidos 4820 Tecnylab (Valencia. España) durante 2 minutos y finalmente se pulieron con un papel de SiC de grano 1.200 durante 1 minuto. Un microscopio de barrido láser confocal (MIC-04 OLYMPUS FV1000), equipado con una lente de inmersión en aceite de 60 x/1.4 NA y un láser de ion de argón/helio de 514 nm (Fig. 20), se utilizó para analizar la ultramorfología y la micropermeabilidad a lo largo de las interfases de DAC; la emisión de fluorescencia se registró a 512-538 y 585-650 nm, respectivamente. Las imágenes ópticas de reflexión y fluorescencia se capturaron desde 5µm por debajo de la superficie exterior hasta 25µm de profundidad, posteriormente se convirtieron en proyecciones topográficas y/o únicas utilizando el software de procesamiento Olympus fluoview (Fig.22), versión 4.2 (FV10-ASW 4.2) (39).

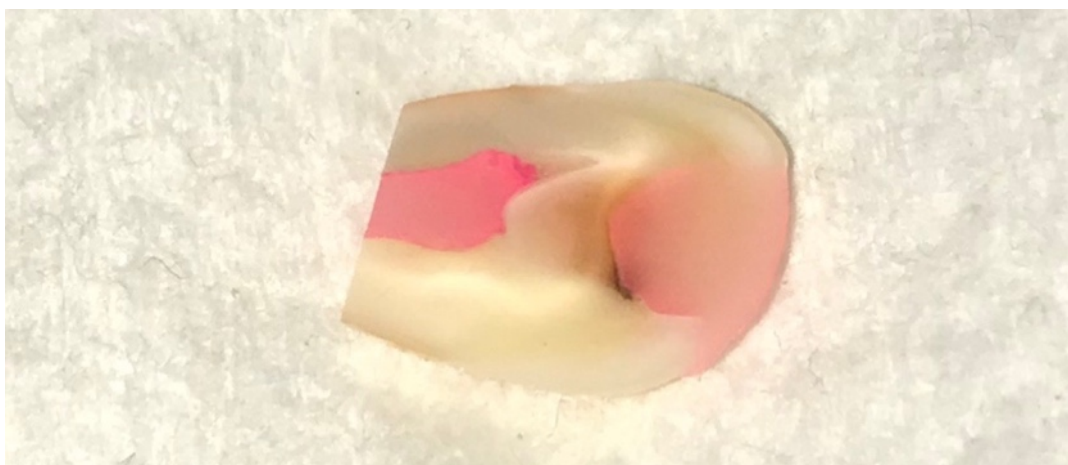


Fig. 21. Ejemplo muestra teñida con fluoresceína 1% para microscopía confocal.

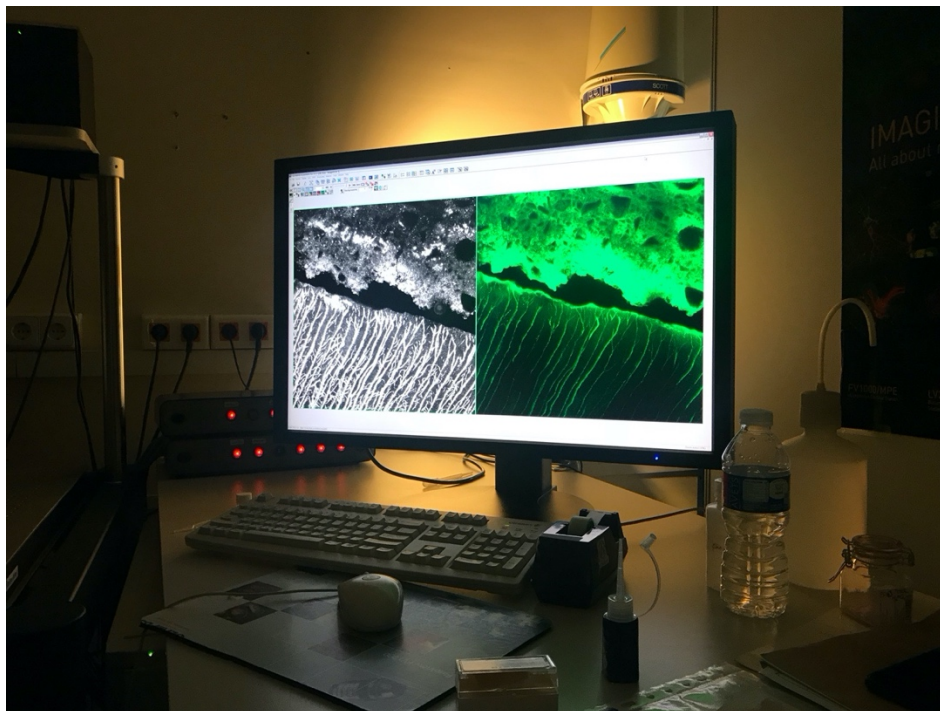


Fig. 22. Imagen ejemplo del software FV10-ASW 4.2 sobre una muestra.

3.2.8 Microdureza.

Se seleccionaron 9 muestras con el objetivo de realizar un estudio preliminar, elegidas aleatoriamente de todos los grupos a T0 (Fig.23), y se evaluó la microdureza sobre 6 puntos de la dentina a lo largo de la interfase, desde la periferia al centro. Además, recogimos información visual del aspecto de la dentina en cada zona. El número de dureza Vickers (VHN) se calculó a partir de 6 hendiduras de diamante que se hicieron a 50 μm por debajo de la interfaz anatómica de cada espécimen. Se usó un microdurómetro Vickers (HMV, Shimadzu, Kyoto, Japón, situado en el laboratorio de la UV), con una carga de 1 Newton (100 g) aplicada durante 15 s.

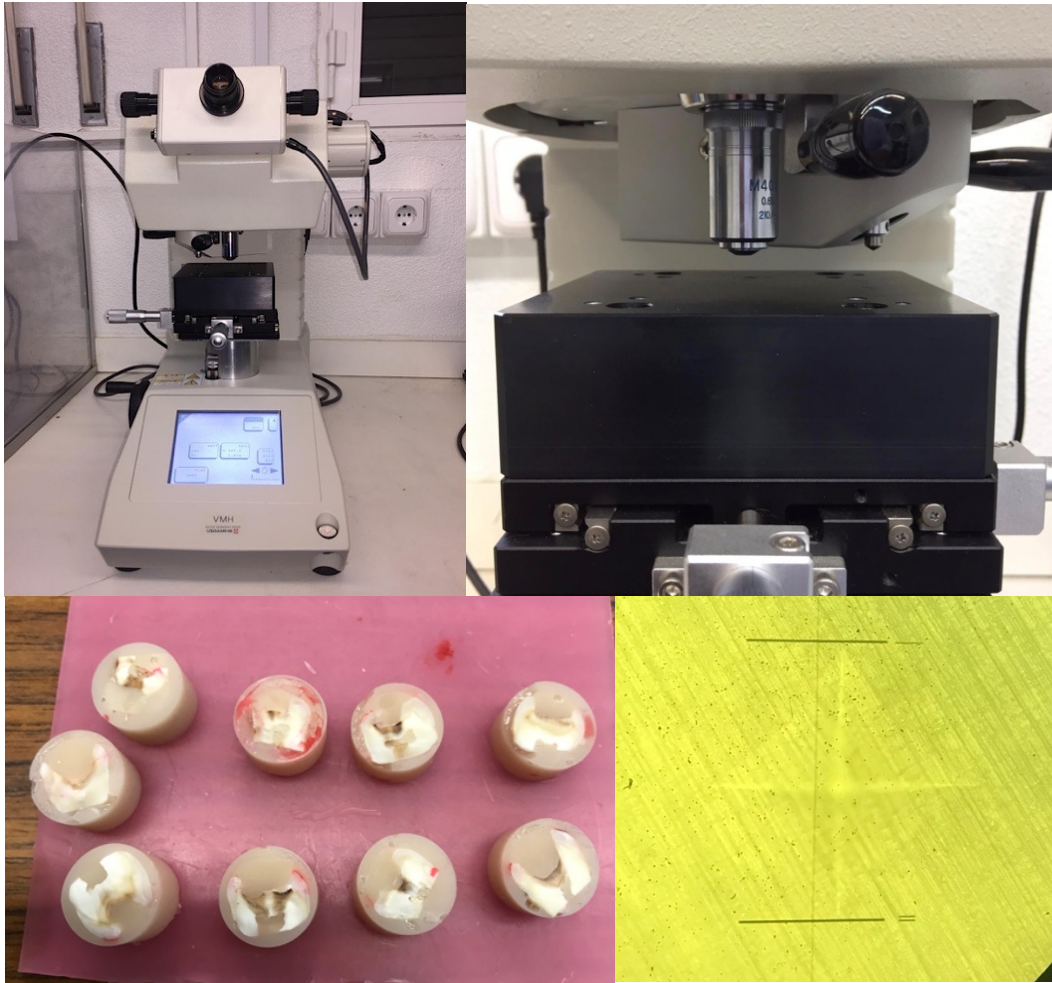


Fig. 23. Microdurómetro utilizado SHIMADZU.

Muestras y huella del “indentador” debajo.

3.2.9 Análisis estadístico.

Se realizó un *análisis descriptivo* que proporciona los estadísticos más relevantes para todas las variables recogidas en la investigación: media, desviación estándar, mínimo, máximo y mediana (para variables continuas) y frecuencias absolutas y relativas. Puede consultarse en su totalidad en el ANEXO 4, en formato de tablas simples y cruzadas.

La normalidad de la variable fuerza a la tracción, se contrasta mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov; la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de

Levene. En ambos casos se han observado algunas desviaciones del patrón normal; aunque el gran tamaño muestral asegura la robustez de un enfoque paramétrico.

Se desarrolló un modelo lineal general de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, con factores entre sujetos grupo y tiempo de evaluación. El modelo estimará los efectos principales de dichos factores, así como la interacción entre los mismos. Se desarrollarán comparaciones múltiples con la prueba de Bonferroni.

La prueba de Kruskal-Wallis se emplea para determinar la homogeneidad de distribuciones de tipo de fractura o la concentración de un determinado elemento químico según tipo de adhesivo. La prueba de Mann-Whitney para la misma finalidad entre un par específico de adhesivos o entre los dos tiempos de medición de un mismo material. Para evitar la propagación de error estadístico de tipo I se aplicará también el criterio de Bonferroni.

Para el análisis de la microdureza se estimaron intervalos de confianza al 95%, para la mediana de las distribuciones, con el fin de compararlos con los rangos esperados (teóricos) de dureza en DAC.

El *nivel de significatividad* empleado en los análisis ha sido el 5% ($\alpha=0.05$)². En algunas pruebas se indica la aplicación del criterio de Bonferroni y la correspondiente corrección de este nivel de referencia general.

Para la prueba F del modelo de análisis de varianza, con un nivel de confianza del 95% y considerando un tamaño del efecto $f=0,25$ (moderado), la potencia alcanzada es 76,6% en una muestra como la actual ($n=182$).

²Cualquier p-valor menor a 0.05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa. Por contra, un p-valor mayor o igual a 0.05 indica ausencia de relación.

3.3 DAC “artificial”.

3.3.1 Diseño del estudio.

La preparación de los especímenes se resume en la Fig. 24. En primer lugar, para probar la actividad remineralizante de cuatro materiales diferentes de ion/liberación aplicados en las lesiones cariosas de DAC “artificial”, se utilizó un dispositivo de doble cámara (91). Este dispositivo permitió la simulación de flujo de líquido en el lado pulpar del disco de DAC, así como una posible remineralización desde allí, y por otro lado permitió también evaluar los efectos restauradores del lado coronal del disco. Se indujeron tres tipos de lesiones desmineralizadas artificialmente en discos de dentina humana: (D1) Lesiones poco profundas inducidas químicamente (n= 12), (D2) Lesiones profundas inducidas químicamente, (n= 12), (D3) Lesiones profundas inducidas por bacterias (n= 16).

La pérdida de minerales en la línea de base se midió mediante MRT y se determinó la microdureza de la superficie de la línea de base. Los especímenes se restauraron utilizando tres materiales convencionales que liberan iones (CIVMR, MTA, BIO) y un sistema adhesivo experimental con resina bioactiva/biomimética (EXP-SE). Las muestras se expusieron posteriormente a saliva artificial cíclica y enjuagues con flúor durante un período de 12 semanas. Posteriormente, se repitieron las medidas de MRT y microdureza. Además, se seleccionaron y analizaron tres muestras representativas de cada grupo a través de microscopía electrónica de transmisión (MET) y confocal.

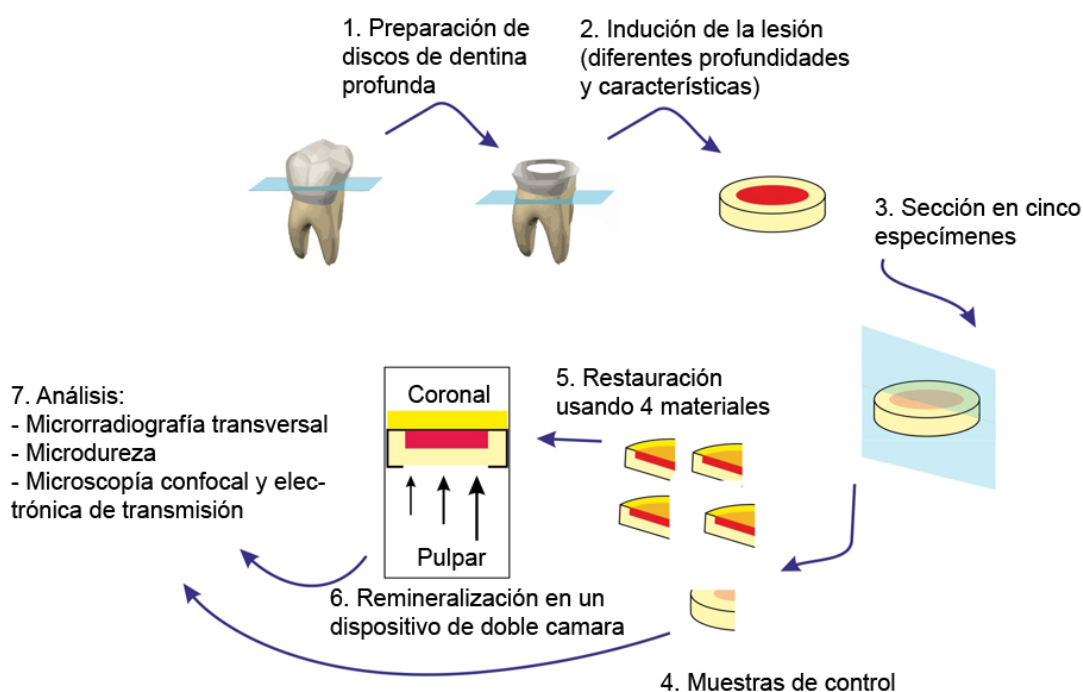


Fig. 24. Representación esquemática del diseño del estudio. ANEXO 1.

3.3.2 Preparación de los especímenes.

3.3.2.1 Material y equipamiento (orden alfabético).

- Adhesivo Experimental.
- BIO, Biodentine, Septodont (Niederkassel. Alemania).
- Bombas peristálticas multicanal 8152 Standard, MCP (Glattbrugg. Alemania).
- Clearfil SE Bond Kuraray (Tokio. Japón).
- Composite fluido Tetric Evo Flow. Ivoclar Vivadent (Schaan. Liechtenstein).
- Computadora personal TMR para Windows 2.0.27.2, Inspector Research, (Amsterdam. Países Bajos).
- Disco de pulido granulometría 1.200 Struers (Copenhague. Dinamarca).
- Disco de corte (Band Saw 300cl; Exakt Apparatebau, Norderstedt. Alemania).
- Esmalte de uñas Maybelline (Nueva York. EE.UU).

- Fijador de Karnovsky (St. Louis. EE.UU).
- Fuente de rayos X de cobre filtrada con níquel PW 1730/10, Philips, (Eindhoven. Países Bajos).
- Fuente de rayos X PW 1730/10, Philips (Eindhoven. Países Bajos).
- HCl 10 M Roth (Karlsruhe. Alemania).
- KOH 10 M Sigma Aldrich (St. Louis. EE.UU).
- Lactobacillus rhamnosus DSM 20247, DSMZ (Braunschweig. Alemania).
- Máquina JEM-1230 TEM JEOL (Tokio. Japón).
- Medio de Man-Rogosa-Sharpe MRS. Roth (Karlsruhe. Alemania).
- Microscopio universal Axioskop2 60318, Zeiss (Oberkochen. Alemania).
- Microdurómetro Vickers HMV, Shimadzu (Kyoto. Japón).
- Microscopio óptico de fluorescencia DEM2500 LED Leica (Mannheim. Alemania).
- Microscopio de barrido láser confocal Leica SP5 CLSM (Heidelberg. Alemania).
- MTA, Pro Root MTA ,Dentsply Sirona (Ballaigues, Suiza).
- OPT. Optibond FL,Kerr (Bioggio. Suiza).
- Papeles abrasivos SiC 1200, 2400 y 4000 SiC (Mikroschleif system 400 CS).
- Películas Fuji fine 71337, Fujifilm (Tokio. Japón).
- Pellets de algodón Roeko. Coltene (Langenau. Alemania).
- Pulidora Labopol 1 Struers (Copenhague.Dinamarca).
- Resina epoxi.
- RIVA LC, CIVMR. SDI (Victoria. Australia).
- Saliva artificial (solución acuosa de una proteína, la mucina, y de los quelantes sodio y triamonio citrato).
- Sistema de análisis de imágenes digitales XC 77 CE, Sony (Tokio. Japón).
- Sistema de doble cámara.

- Software de procesamiento de imágenes Leica SP5 CLSM (Mannheim. Alemania).
- Solución 5 litros de solución desmineralizadora (pH 5,3), que contiene ácido acético 50 mM, $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ 3 mM, KH_2PO_4 3 mM y metilhidroxidifosfonato 6 mM. (St. Louis. EE.UU).
- Solución NaF 200ppm (St. Louis. EE.UU).
- Solución tampón (calcio, magnesio, fosfato y albúmina), (St. Louis. EE.UU).
- Tetróxido de osmio al 1% (St. Louis. EE.UU).
- Tubo vertical PW 2213/20, Panalytical, Kassel.

3.3.2.2 Proceso.

Se obtuvieron cincuenta molares humanos extraídos, sin lesiones y/o restauraciones, con un consentimiento informado basado en un protocolo ético aprobado (comité de ética de la Charité – Universitäts medizin Berlin EA4/102/14).

Se eliminaron ambas raíces y el esmalte coronal (Band Saw 300cl; Exakt Apparatebau, Norderstedt, Alemania) hasta que se alcanzó la dentina profunda, el espécimen/disco final consistió en una dentina residual de 1,5 mm medida con un calibre. Los discos se paralelizaron en planta y se pulieron utilizando papeles abrasivos SiC 1.200, 2400 y 4000 SiC (Mikroschleif system 400 CS). Las muestras se cubrieron con barniz de uñas resistente a los ácidos, (Maybelline, Nueva York, NY, EE.UU) dejando una ventana redonda (5 mm de diámetro) en la superficie oclusal.

Se crearon tres tipos de lesiones cariosas artificiales en esta ventana no protegida, siguiendo diferentes protocolos validados (74–76):

- (D1) Lesiones superficiales inducidas químicamente (n= 12). Se crearon almacenando las muestras en 5l de una solución desmineralizadora (pH 5.3, 37°C), que contiene ácido acético 50 mM, $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ 3 mM, KH_2PO_4 3 mM

y metilhidroxidifosfonato 6 mM durante 14 días. El pH de la solución se controló diariamente (InLab micro, Mettler-Toledo, Giessen, Alemania) y, si fuera necesario, se ajustó con HCl o KOH 10 M. Los productos químicos (excepto el HCl) se adquirieron a Sigma Aldrich (St. Louis, EE.UU). El HCl fue fabricado en Roth (Karlsruhe, Alemania).

- (D2) Lesiones profundas inducidas químicamente (n= 12). Se crearon mediante el almacenamiento de las muestras en la misma solución de ácido acético durante 28 días.
- (D3) Lesiones profundas inducidas por bacterias (n= 16). Se crearon desmineralizando primero en la solución de ácido acético durante 7 días, seguido de desmineralización bacteriana. Para este último paso, se utilizó un modelo de biofilm de cultivo continuo controlado por computadora (92). *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 20247, DSMZ, Braunschweig, Alemania), se cultivó durante la noche en medio de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Roth) a 37°C. Luego, los cultivos se transfirieron al modelo de biopelícula, donde se les proporcionó MRS suplementado con glucosa al 2% mediante bombas peristálticas multicanal (8152 Standard, MCP, Glattbrugg, Alemania), durante 10 minutos, cuatro veces al día, durante un total de 2 días. Entre las comidas simuladas, las biopelículas se cultivaron en reposo a 37°C a una humedad del 100%. Finalmente, la biopelícula se eliminó mediante un intercambio estéril, las muestras se enjuagaron bien, el esmalte de uñas se eliminó por completo de las superficies coronal y pulpar (93), y de cada disco, la sección perpendicular fue cortada como control basal. El disco restante se cortó en cuatro partes, cada una restaurada con un material diferente.

3.3.3 Materiales de restauración.

En esta parte se probaron los siguientes materiales:

- CIVMR. RIVA LC (Riva, SDI, Victoria, Australia). No lo cubrimos con ningún

otro material.

- EXP-SE. Un sistema adhesivo experimental en modo SE, que es el mismo que utilizamos anteriormente en la primera parte del material y método, cubierto por composite fluido (Tetric Evo Flow, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) con un espesor de 2mm.
- BIO. Biodentine (Septodont, Niederkassel, Alemania), un cemento de silicato tricálcico que se mezcló según las instrucciones del fabricante y se colocó en una capa delgada de 0,5-1,0 mm de espesor. El cemento se cubrió con una bolita de algodón húmedo y se dejó en reposo durante 15 minutos para lograr una reacción de fraguado adecuada. Posteriormente, estas muestras se cubrieron con un adhesivo comercial (Clearfil SE Bond, Kuraray, Tokio, Japón) aplicado según las instrucciones del fabricante, seguido de un composite fluido (Tetric Evo Flow), como se describió anteriormente.
- MTA. Pro Root MTA (Dentsply Sirona, Ballaigues, Suiza), mezclado según las instrucciones del fabricante y colocado en una capa delgada de 0.5-1.0 mm de espesor. Además, este cemento se cubrió con una bolita de algodón mojada y se dejó reposar durante 15 minutos para lograr una reacción de fraguado adecuada. Finalmente, los especímenes fueron restaurados como se describió anteriormente para el grupo 3 (BIO).

3.3.4 Fase de remineralización.

Las muestras se montaron en la iluminación de un sistema de doble cámara hecho a medida (Fig. 24), con superficies pulpaes y coroneales expuestas a dos cámaras diferentes (91). El uso de este sistema permite proporcionar remineralización simultánea desde la administración coronaria (inducida por los materiales) y mineral pulpar, como sucedería clínicamente (94). La cámara coronal se llenó con saliva artificial, un medio a base de mucina para simular el medio oral (95).

Cada 2 semanas, las superficies coronales de todas las muestras se enjuagaron adicionalmente con 200 ppm de solución de NaF durante 5 minutos, para permitir la posible recarga de CIVMR con fluoruro y simular un escenario real en el que se utilizan pastas dentales y/o enjuagues bucales. La cámara pulpar se sumergió en fluido pulpar simulado (que contenía tampón, calcio, magnesio, fosfato y albúmina), a una presión pulpar constante de 2,94Kpa (96). Las cámaras se almacenaron a 37°C y bajo agitación suave (70 rpm) durante tres meses, reemplazando los fluidos coronal y pulpar cada dos semanas.

3.3.5 Microrradiografía Transversal (MRT).

Se usó la MRT para estimar la pérdida mineral integrada (Z) de las muestras de referencia y de las muestras mineralizadas. De cada microrradiografía, se utilizaron tres áreas estandarizadas para determinar la pérdida de minerales. Se calcularon las diferencias absolutas de pérdida de minerales (Z) para cada área, con diferencias positivas que indican ganancias de minerales y medias para cada muestra utilizada para el análisis estadístico.

Las microrradiografías se obtuvieron mediante una fuente de rayos X de cobre filtrada con níquel (PW 1730/10, Philips, Eindhoven, Países Bajos) que funciona a 20 kV y 10 mA con un tubo vertical (PW 2213/20, Panalytical, Kassel). La distancia de la película para obtener las radiografías fue de 280mm. Las películas (Fuji fine 71337, Fujifilm, Tokio, Japón) se expusieron durante 5 segundos y se desarrollaron en condiciones estandarizadas de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las microrradiografías se analizaron con un sistema de análisis de imágenes digitales (XC 77 CE, Sony, Tokio, Japón) interconectado con un microscopio universal (Axioskop2 60318, Zeiss, Oberkochen, Alemania) y una computadora personal (TMR para Windows 2.0.27.2, Inspector Research, Amsterdam, Países Bajos).

3.3.6 Microdureza.

Las muestras se cortaron perpendicularmente a la superficie oclusal que había estado en contacto con los materiales de restauración. Se obtuvieron dos interfases de cada espécimen y se incrustaron en resina epoxi con la cara de corte transversal expuesta. La superficie se pulió en serie hasta un acabado de 1 μm . El número de dureza Vickers (VHN) se calculó a partir de diez hendiduras de diamante que se hicieron a 50 μm por debajo de la superficie oclusal anatómica de cada espécimen. Se usó un microdurómetro Vickers (HMV, Shimadzu, Kyoto, Japón), situado en el laboratorio de la UV, con una carga de 1 Newton (100 g) aplicada durante 15 s.

3.3.7 Microscopía de fluorescencia y confocal.

Se emplearon tres muestras de DAC ejemplares de la evaluación de microdureza, tanto para fluorescencia óptica como para microscopía confocal, para poder determinar las características de las interfases de dentina desmineralizada/remineralizada. Las muestras se sumergieron en una solución acuosa de fluoresceína al 1% en peso durante 24 horas y luego se enjuagaron en un baño de ultrasonidos, durante 2 minutos, que contenía agua destilada. Los especímenes se pulieron utilizando un papel de SiC de granulometría 1.200 durante 30 segundos, seguido de un enjuague más en un baño de ultrasonidos (2 min).

Las muestras se evaluaron por primera vez en un microscopio óptico de fluorescencia (DEM 2.500 LED), equipado con una luz LED y un paso de filtro (490-520 nm) y una lente de inmersión en aceite 20 \times NA 0,7. Posteriormente, las muestras se examinaron utilizando un microscopio de barrido láser confocal (Leica SP5 CLSM; Leica, Heidelberg, Alemania), equipado con una lente de inmersión en aceite de 63 \times / 1.4 NA y un láser de ion de argón/helio de 514 nm.

Las imágenes de reflexión de microscopía de barrido confocal y de fluorescencia se obtuvieron con un paso z de 1 μm para seccionar ópticamente las muestras a una profundidad de hasta 20 μm por debajo de la superficie. La exploración del eje z de

la superficie de la interfaz se compiló en una sola proyección, utilizando el software de procesamiento de imágenes Leica SP5 CLSM (Leica, Heidelberg, Alemania). La configuración del sistema se estandarizó y se usó en la misma configuración para toda la investigación. Cada interfaz de dentina se investigó completamente y se capturaron y registraron cinco micrografías que representan las características morfológicas más comunes observadas en las muestras.

3.3.8 Microscopía electrónica de transmisión (MET).

Se usaron otras tres muestras representativas de cada grupo previamente testadas con microdureza para MET. Las muestras se fijaron en el fijador de Karnovsky, se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio al 1%, se deshidrataron en una serie de etanol ascendente (30–100%), se transitaron a través de óxido de propileno y se embebieron en resina epoxi.

Se prepararon secciones gruesas (180–200nm) de los especímenes que incluyen la base de dentina mineralizada sin desmineralización adicional y se examinaron sin teñir para evaluar el efecto general de la remineralización. Los bloques de resina se recortaron luego para la preparación de la sección delgada (90nm). El examen se realizó utilizando una máquina JEM-1230 TEM a 110KV (JEOL, Tokio, Japón), situada en el servicio central de apoyo a la investigación experimental de la universidad de Valencia.

3.3.9 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el SPSS 20 (IBM, Chicago, IL, EE.UU). La distribución de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Se realizó un modelado lineal generalizado (GLM) para determinar las diferencias entre los grupos. El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$.

4. Resultados.

4. RESULTADOS.

4.1 DAC “natural”.

Todos los resultados estadísticos en tablas y gráficos de μ TBM, microanálisis MEB-EDX y microdureza se adjutan en el ANEXO 4.

4.1.1 Ensayo de μ TBM.

La muestra para la investigación está constituida, inicialmente, por 213 muestras distribuidas según tipo de adhesivo (grupo) y tiempo del ensayo según la tabla siguiente:

T1-TOTAL DE MUESTRAS: GRUPO Y TIEMPO.

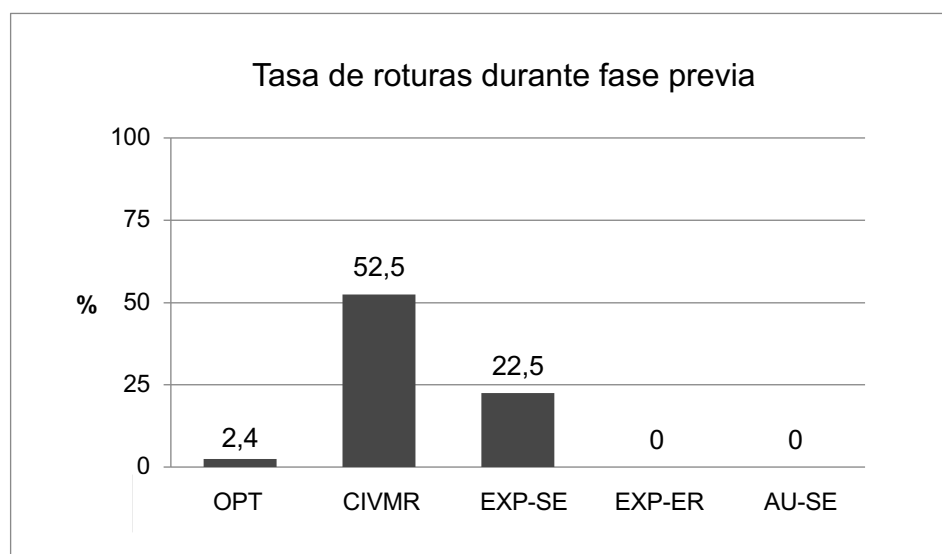
	TIEMPO					
	Total		Basal		1 año	
	N	%	N	%	N	%
Total	213	100,0%	111	52,1%	102	47,9%
OPT	42	19,7%	20	9,4%	22	10,3%
CIVMR	40	18,8%	20	9,4%	20	9,4%
EXP-SE	40	18,8%	20	9,4%	20	9,4%
EXP-TE	42	19,7%	22	10,3%	20	9,4%
AU	49	23,0%	29	13,6%	20	9,4%

Un total de 31 especímenes no soportaron la preparación y corte previo, por lo que sólo en 182 pudo realizarse el ensayo de tracción, constituyendo ésta la muestra válida para la investigación:

T3-MUESTRAS VÁLIDAS: GRUPO Y TIEMPO.

	TIEMPO					
	Total		Basal		1 año	
	N	%	N	%	N	%
Total	182	100,0%	94	51,6%	88	48,4%
OPT	41	22,5%	19	10,4%	22	12,1%
CIVMR	19	10,4%	10	5,5%	9	4,9%
EXP-SE	31	17,0%	14	7,7%	17	9,3%
EXP-ER	42	23,1%	22	12,1%	20	11,0%
AU-SE	49	26,9%	29	15,9%	20	11,0%

La tabla 2 del ANEXO 4, describe el desenlace del trabajo de corte para la obtención de las barritas ***previo al ensayo de resistencia a la tracción***. Seguidamente se representa el porcentaje de muestras que no superaron esa fase del proceso:

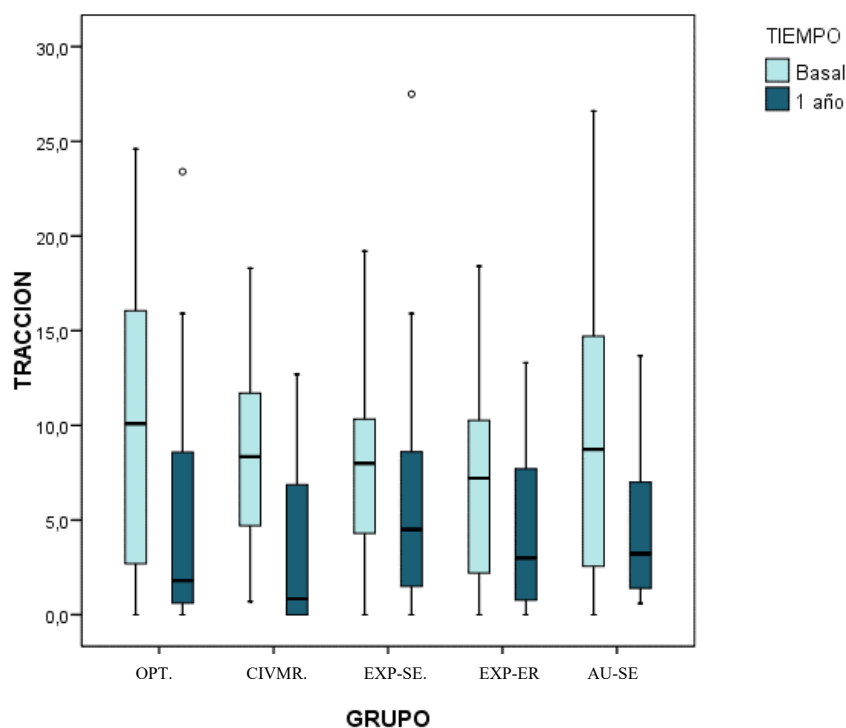


La mayoría de las roturas corresponden a barritas del grupo CIVMR (52,5%) y del grupo EXP-SE (22,5%).

Se ha representado la tasa total, sin distinguir T0 de T1. Esto es así porque, según la tabla T2, la tasa de ambos tiempos, para un mismo grupo, es muy similar:

- 5% y 0% para OPT
- 50% y 55% para el CIVMR
- 30% y 15% para el EXP-SE (en este grupo observamos más problemas al cortarlas en tiempo 0)

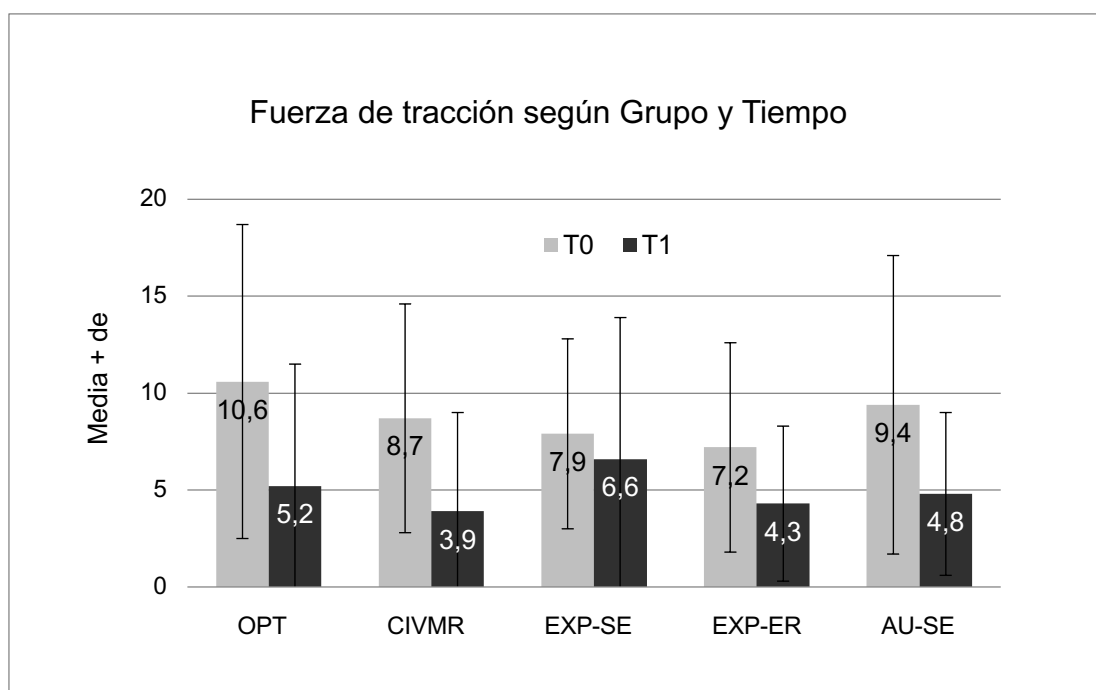
La tabla T4 describe la **fuerza a la microtracción**. El siguiente gráfico ilustra las distribuciones de valores observadas:



La caja concentra al 50% de los casos, siendo la mediana la línea horizontal que la divide. Los bordes superior e inferior de la caja se corresponden con el 1er y 3er cuartil, por debajo de los cuales está el 25% y 75% respectivamente de la muestra. Los “bigotes” se extienden hasta los valores en un rango aceptable, por encima de los cuales están los atípicos (círculos) y los extremos (asteriscos).

La impresión descriptiva es que los resultados a T0 y a T1 son bastante distintos. Así como en el momento basal, los grupos OPT y AU-SE, exhiben resistencias más altas (también mayor variabilidad entre piezas), al cabo de 1 año los especímenes EXP-SE dan el mejor resultado, al tiempo que los anteriores experimentaron una pérdida de adhesión muy relevante.

En términos de medias se obtiene esta tabla:



Las conclusiones descriptivas anteriores siguen siendo válidas para esta tabla. Aunque todos los materiales pierden capacidad protectora, los experimentales, y especialmente EXP-SE, pierden menos, aunque no de forma estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

T3.1.1-PÉRDIDA DE RESISTENCIA ADHESIVA (T0-T1): diferencia absoluta media \pm error estándar (Mpa) y relativa (%):

	Mpa	%
OPT	-5,32 \pm 2,25	-50,4
CIVMR	-4,76 \pm 2,54	-54,6
EXP-SE	-1,26 \pm 2,29	-15,9
EXP-ER	-2,94 \pm 1,47	-40,8
AU-SE	-4,56 \pm 1,89	-48,6

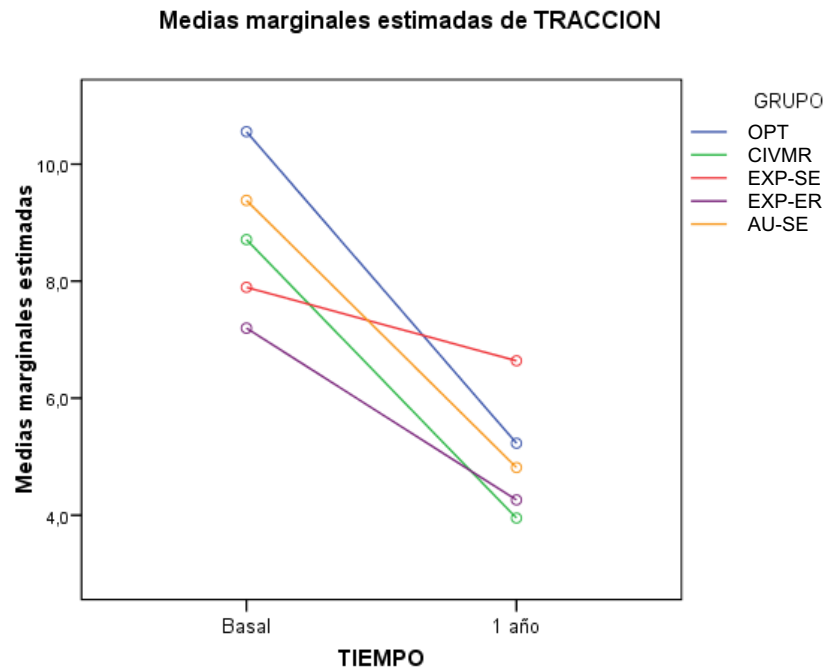
El modelo ANOVA evalúa el efecto del tipo de adhesivo y tiempo de medición sobre la fuerza:

T3.1.2-RESISTENCIA SEGÚN GRUPO Y TIEMPO: resultado test F del modelo lineal general ANOVA de 2 vías:

	p-valor
Grupo	0,583
Tiempo	<0,001***
Grupo x tiempo	0,661

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

La conclusión principal del modelo es que se produce una reducción significativa de la resistencia adhesiva durante el año de seguimiento (p<0,001). Sin embargo, esta reducción es, según el modelo, bastante similar entre todos los grupos (p=0,661).



En efecto, 4 de los 5 materiales experimentaron una pérdida de resistencia de magnitud similar. Esta es una razón por la que se admitiría una similitud general entre materiales. Por otro lado, las desviaciones estándar son grandes y no permiten hablar de grandes efectos.

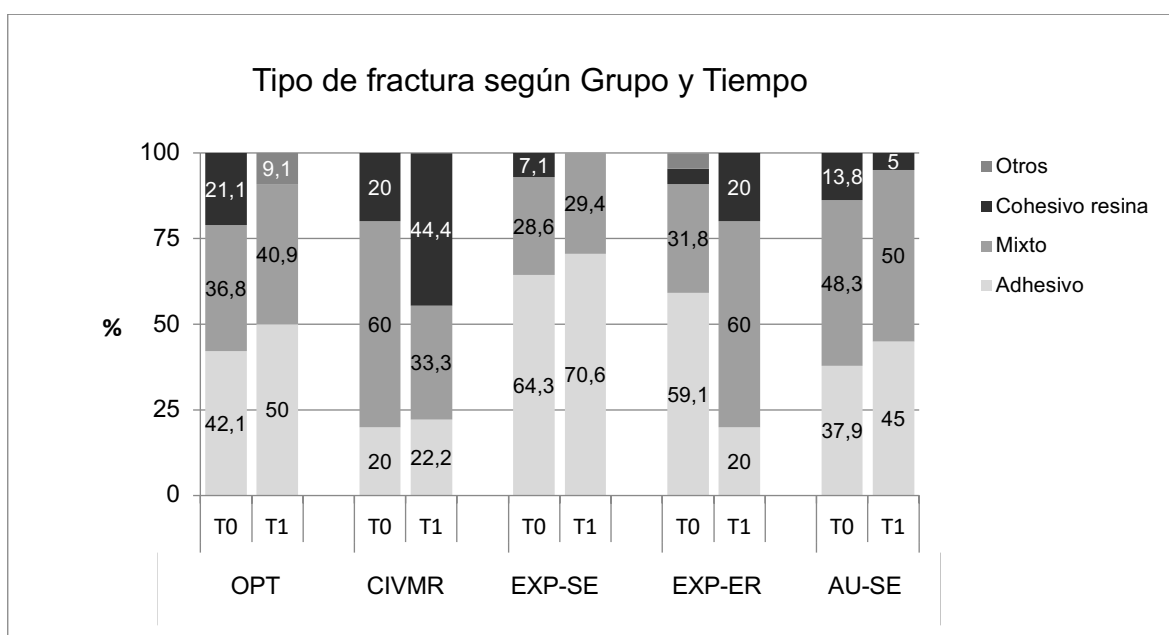
Un quinto material (EXP-SE), destaca por un patrón más mantenido a lo largo del tiempo. Las pruebas de comparación múltiple son la clave para entender qué está pasando. Las pruebas *post-hoc* de Bonferroni permiten concluir acerca de los cambios con el paso del tiempo y sus diferencias entre grupos (la interacción).

- Los grupos OPT y AU-SE pierden resistencia de forma significativa tras 1 año ($p=0,007$ y $p=0,012$, respectivamente).
- CIVMR lo hace con una fuerte tendencia ($p=0,096$).
- Los EXP son los más estables aunque no estadísticamente significativos: SE incluso más ($p=0,575$) que ER ($p=0,127$).

La interacción está sujeta a un análisis recíproco: en T0 cualquier par de materiales presentan la misma resistencia y en T1 sucede lo mismo.

TIPO DE FRACTURA.

De la tabla T5 del ANEXO 4, se deduce que la gran mayoría de fracturas son de tipo adhesivo (44,5%) o mixtas (42,3%) a inspección macroscópica. Se representa la distribución por grupo y tiempo de realización del ensayo.



A la hora de describir la tabla, podemos hablar claramente de 3 grupos:

1. Los grupos OPT y AU-SE rompen por la interfaz adhesiva o en modo mixto en proporción similar. Además, el tipo de fractura se mantiene a lo largo del tiempo.
2. Las muestras con EXP-SE tienden a presentar fractura adhesiva a T0 y similar proporción adhesivas/mixtas/cohesivas a lo largo del tiempo.
3. En el CIVMR y en EXP-ER predominan las mixtas o cohesivas y la tendencia tras 1 año es a una mayor probabilidad de rotura cohesiva, lo cual puede ser

compatible con que se haya producido la remineralización de la interfase-DAC.

Mediante test no paramétricos se contrasta si la distribución de tipos de fractura en cada tiempo específico es similar entre grupos:

T3.1.3A-TIPO DE FRACTURA SEGÚN GRUPO POR TIEMPO DE ENSAYO:

resultados test Kruskal-Wallis.

	p-valor
En TIEMPO=0	0,099
En TIEMPO=1	0,002**

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Obsérvese que sólo se hallan diferencias en el ensayo a T1 ($p=0,002$); pero también una cierta heterogeneidad en T0 ($p=0,099$). Para identificar entre qué grupos se dan las diferencias, se proponen comparaciones múltiples.

T3.1.3B-HOMOGENEIDAD DEL TIPO DE FRACTURA EN T0 SEGÚN GRUPO:

resultados pruebas Mann-Whitney.

	OPT	CIVMR	EXP-SE	EXP-ER
OPT				
CIVMR	0,484			
EXP-SE	0,226	0,064		
EXP-ER	0,178	0,043	0,960	
AU-SE	0,954	0,382	0,120	0,081

*p<0,005; **p<0,001; ***p<0,0001

Al corregir mediante el criterio de Bonferroni ninguna diferencia alcanzó la significancia, si bien, la tendencia más destacable es que los fallos con EXP son habitualmente adhesivos frente al CIVMR con el que predominaron los mixtos.

T3.1.3C-HOMOGENEIDAD DEL TIPO DE FRACTURA EN T1 SEGÚN GRUPO:

resultados pruebas Mann-Whitney.

	OPT	CIVMR	EXP-SE	EXP-ER
OPT				
CIVMR	0,023			
EXP-SE	0,424	0,009		
EXP-ER	0,017	0,472	0,003*	
AU-SE	0,512	0,069	0,167	0,086

*p<0,005; **p<0,001; ***p<0,0001

Tras 1 año, el EXP-SE se distancia del EXP-ER y del CIVMR por su gran proporción de fracturas adhesivas.

Recíprocamente, se evalúa si para un determinado adhesivo hay diferencias en el modo de fallo a T0 y T1:

T3.1.4-HOMOGENEIDAD DEL TIPO DE FRACTURA SEGÚN TIEMPO POR GRUPO: resultados test Mann-Whitney.

	p-valor
En OPT	0,235
En CIVMR	0,549
En EXP-SE	0,710
En EXP-ER	0,006*
En AU-SE	0,450

*p<0,01; **p<0,005; ***p<0,0005

El resultado más interesante es que el modo de fallo de los especímenes del grupo EXP-ER cambia significativamente de T0 a T1 (p=0,006). En efecto, la proporción de adhesivas se reduce de forma considerable.

4.1.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB).

4.1.2.1 *AU-SE.*

A T0 se observaron generalmente fracturas mixtas donde se había quedado material resinoso cubriendo la DAC, también observamos muchos túbulos vacíos y colágeno que no había sido infiltrado perfectamente por el adhesivo (Figs. 25A-25B). A 5.000x apreciamos zonas en la dentina intertubular con muchas fibras colágenas que no habían sido infiltradas, así como túbulos dentinarios vacíos o con tags resinosos que quedaban dentro de los túbulos (Fig. 25C y D).

A T1 observamos restos del material en la dentina, así como partes de la DAC expuesta con túbulos dentinarios vacíos. A 10.000x ya no apreciamos fibrillas colágenas porque probablemente se degradaron (Fig. 26C), y a 20.000 x confirmamos que efectivamente no existían ya fibrillas colágenas expuestas, sino una DAC muy degradada (Fig. 26D).

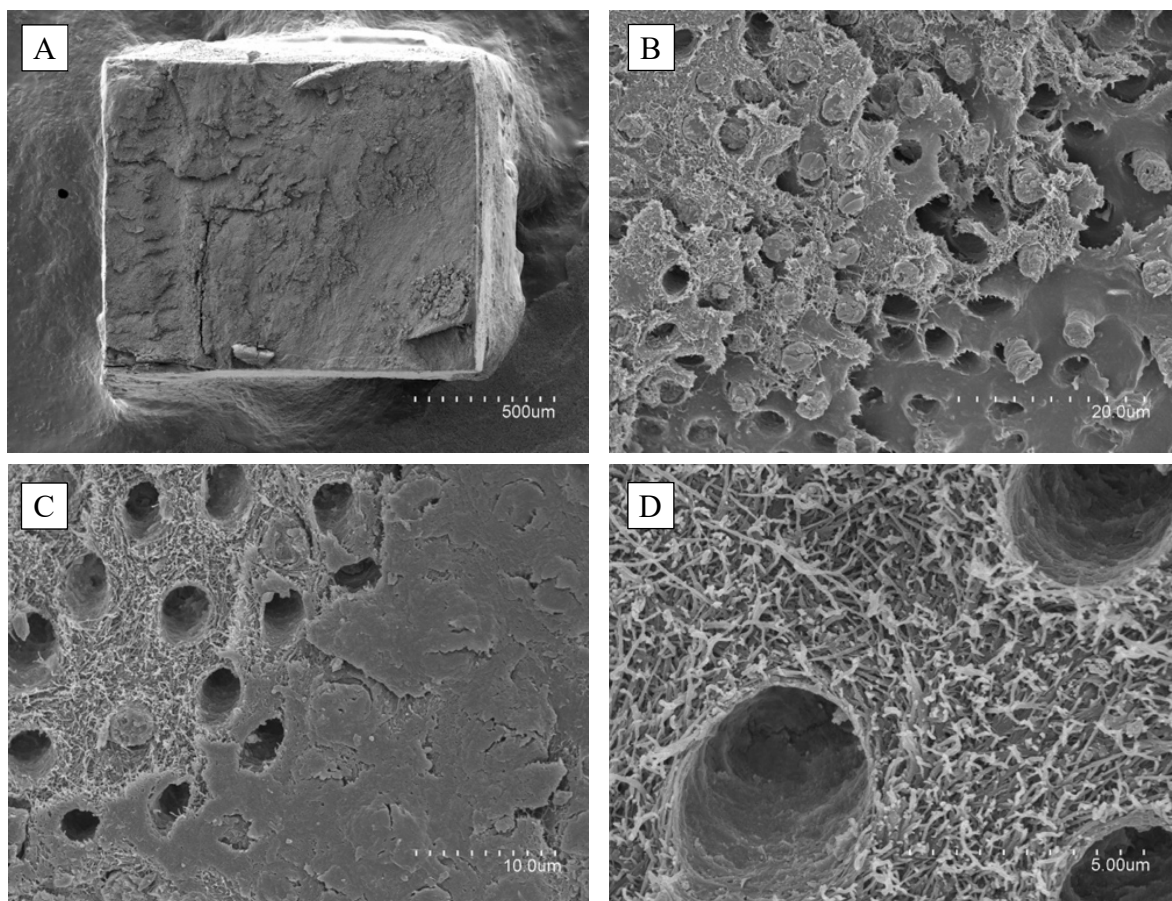


Fig. 25. AU-SE-T0.

A: Microfotografía MEB (Magnificación 50x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde apreciamos una fractura mixta.

B: Microfotografía MEB (Magnificación 1.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde observamos claramente que la fractura es mixta, la DAC aparece delaminada aunque se observan tags resinosos en algunas zonas.

C: Microfotografía MEB (Magnificación 2.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), se observa otra típica fractura mixta, donde se ha quedado material resinoso cubriendo la DAC, pero en otra zona observamos muchos túbulos vacíos o con tags resinosos que quedan dentro de los túbulos. Se aprecia colágeno intertubular que no ha sido infiltrado perfectamente por el adhesivo.

D: Microfotografía MEB (Magnificación 5.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) observamos a mayor magnificación que hay zonas en la dentina intertubular con muchas fibras colágenas que no han sido infiltradas, así como túbulos dentinarios vacíos.

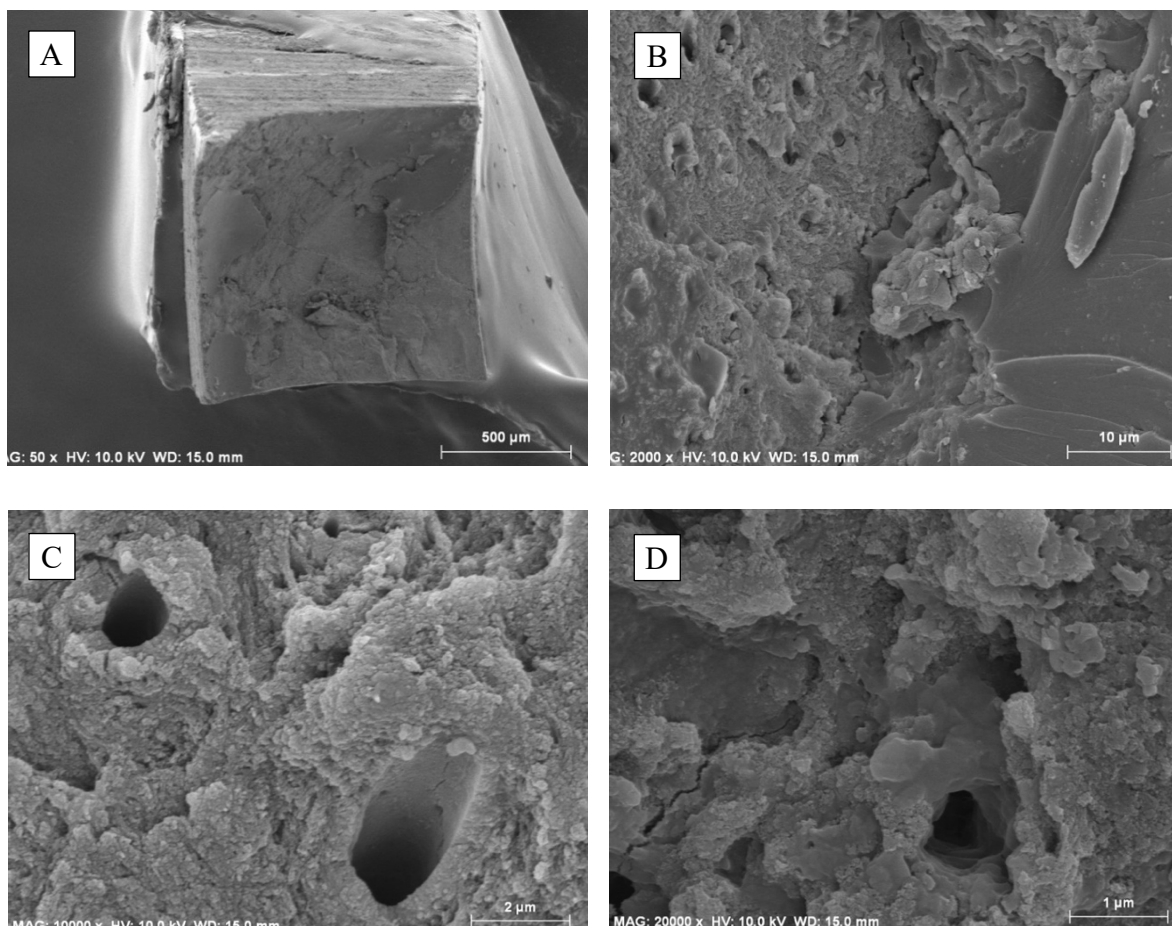


Fig. 26. AU-SE-T1.

A: Microfotografía MEB (Magnificación 50x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde apreciamos una fractura mixta.

B: Microfotografía MEB (Magnificación 2.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde observamos restos del material en dentina, así como partes de DAC expuesta con túbulos dentinarios vacíos.

C: Microfotografía MEB (Magnificación 10.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), donde no apreciamos ya fibrillas colágenas porque probablemente se han degradado.

D: Microfotografía MEB (Magnificación 20.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), donde confirmamos a mayor aumento que no existen fibrillas colágenas expuestas, sino una DAC degradada.

4.1.2.2 OPT.

A T0 también confirmamos que las fracturas eran predominantemente mixtas, observamos una DAC delaminada y con presencia de colágeno sin infiltrar, así como muchos túbulos vacíos (Figs. 27A-27B). A 5.000x, se observaban los túbulos dentinarios al detalle, con posibles tags resinosos, así como gran cantidad de fibrillas colágenas inter e intratubulares completamente desnudas sin infiltración resinosa, susceptibles de degradación con el envejecimiento (Fig. 27C).

A T1 observamos de nuevo fracturas mixtas (Fig. 28A), con la dentina sin restos de resina y con precipitados minerales (Fig. 28B). A 5.000x confirmamos que no se encontraban fibrillas colágenas (Fig. 28C) porque probablemente se habían degradado durante el periodo de almacenamiento. Confirmamos a mayor aumento que no existían fibrillas colágenas, en la Fig. 28D se identifica claramente un túbulo dentinario vacío y en el otro podría existir algún tag de resina.

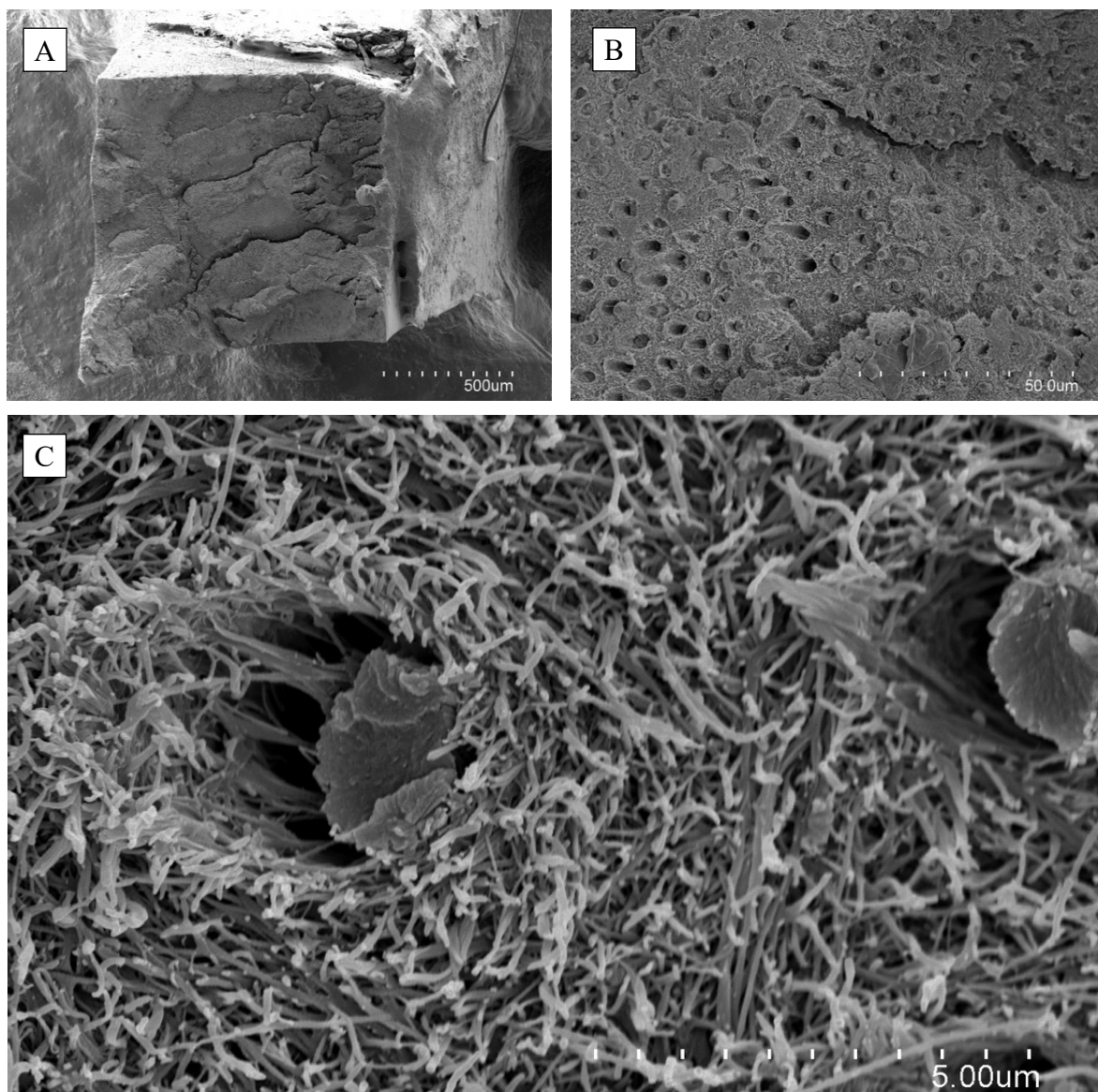


Fig. 27. OPT-T0.

A: Microfotografía MEB (Magnificación 50x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde apreciamos una fractura mixta con el sustrato delaminado en varias capas.

B: Microfotografía MEB (Magnificación 500x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde observamos una DAC delaminada y con la presencia de colágeno intertubular sin infiltrar, así como muchos túbulos vacíos.

C: Microfotografía MEB (Magnificación 5.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), se observan los túbulos dentinarios al detalle, con posibles tags resinosos, así como gran cantidad de fibrillas colágenas inter e intratubulares completamente desnudas sin infiltración resinosa, susceptibles de degradación con el envejecimiento.

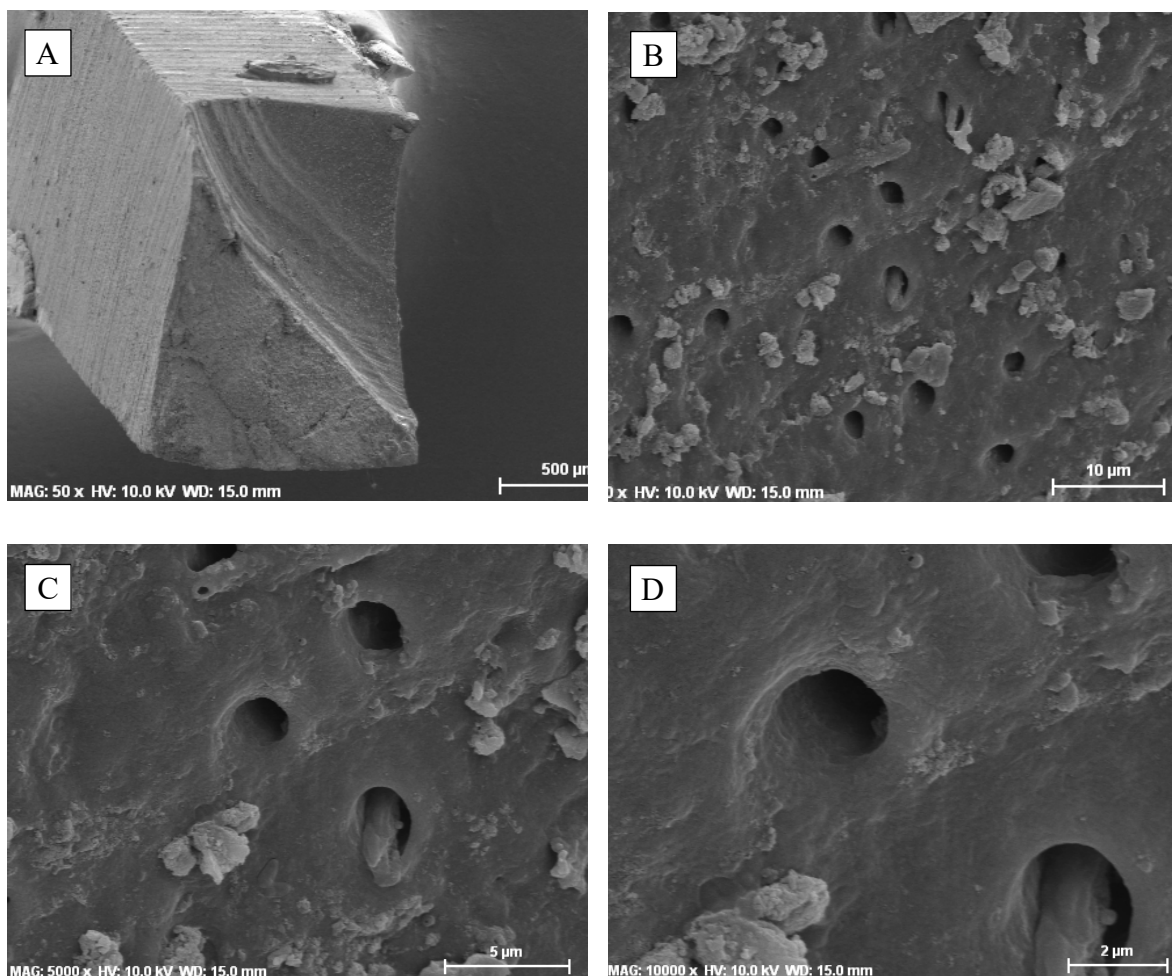


Fig. 28. OPT-T1.

A. Microfotografía MEB (Magnificación 50x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde apreciamos una fractura mixta.

B: Microfotografía MEB (Magnificación 2.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde observamos dentina sin restos de resina y con precipitados minerales.

C: Microfotografía MEB (Magnificación 5.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), donde confirmamos que no se encuentran fibrillas colágenas porque probablemente se han degradado durante le periodo de almacenamiento.

D: Microfotografía MEB (Magnificación 10.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), donde confirmamos a mayor aumento que no existen fibrillas colágenas. Se observa un túbulo dentinario vacío y en el otro podría existir algún tag de resina.

4.1.2.3 CIVMR.

A T0 apreciamos un sustrato más o menos homogéneo, con fracturas aparentemente mixtas que a mayor aumento revelaron que no había rastro de la dentina porque estaba cubierta por el material CIVMR (Figs. 29A-29B). A mayor aumento ya se confirmó la DAC totalmente cubierta, y por eso afirmamos que estábamos ante la típica fractura cohesiva en el material, donde es muy raro que el colágeno quedara expuesto (Fig. 29C).

A T1 observamos también una fractura típica cohesiva que dejaba un sustrato más o menos homogéneo (Fig. 30A). A un aumento de 2.000x apreciamos la DAC cubierta efectivamente por restos del material (Fig. 30B), y a 10.000x confirmamos la protección del colágeno, por lo general era raro que quedara expuesto, aún después de un período largo de almacenamiento (Fig. 30C).

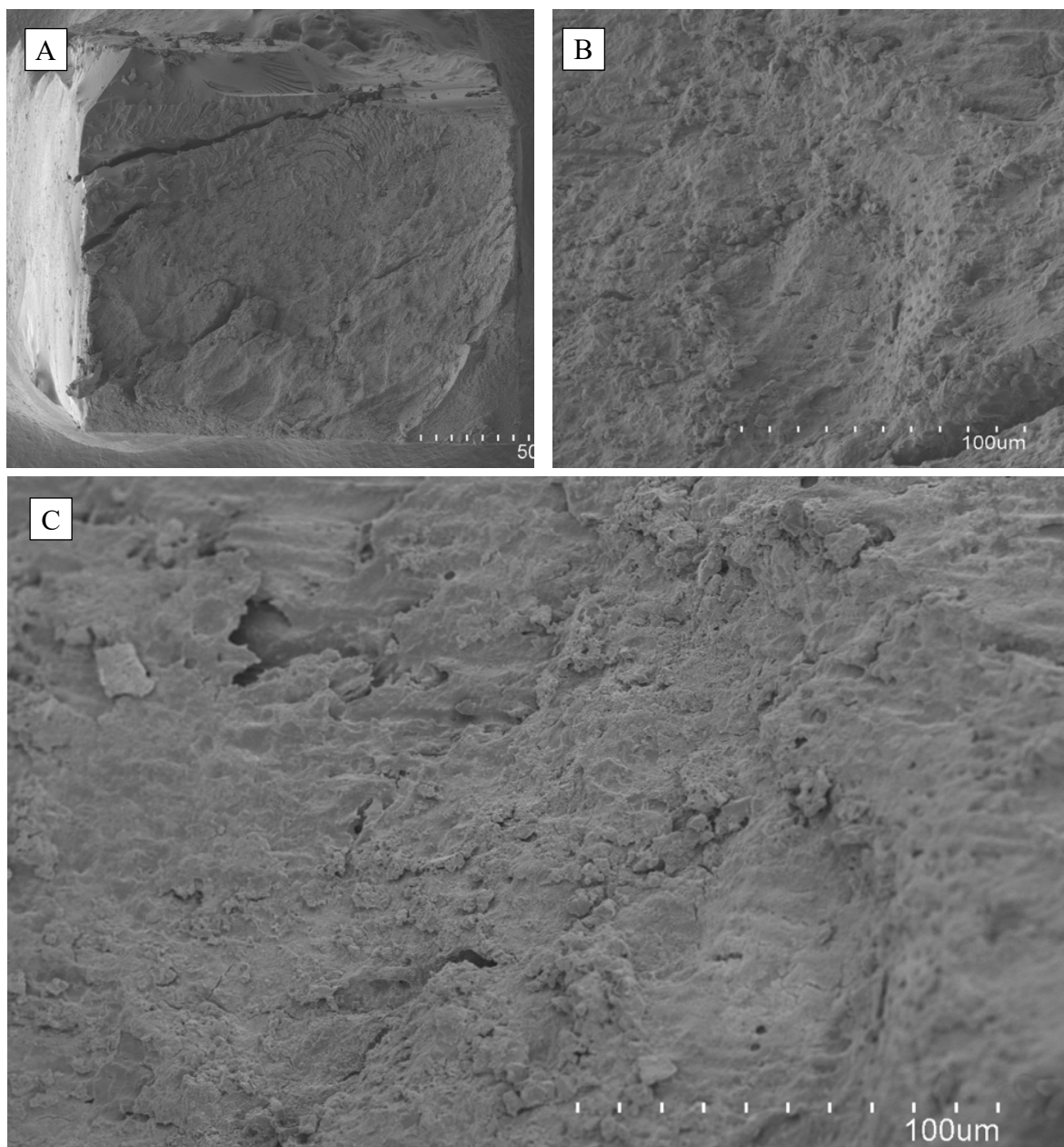


Fig. 29. CIVMR-T0.

A. Microfotografía MEB (Magnificación 50x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde apreciamos un sustrato más o menos homogéneo, con fracturas aparentemente mixtas.

B: Microfotografía MEB (Magnificación 250x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde observamos un sustrato homogéneo, no hay rastro de la DAC que está cubierta por el material CIVMR.

C: Microfotografía MEB (Magnificación 250x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), se confirma la DAC totalmente cubierta y por eso afirmamos que estamos ante la típica fractura cohesiva en el material, donde es muy excepcional que el colágeno quedara expuesto.

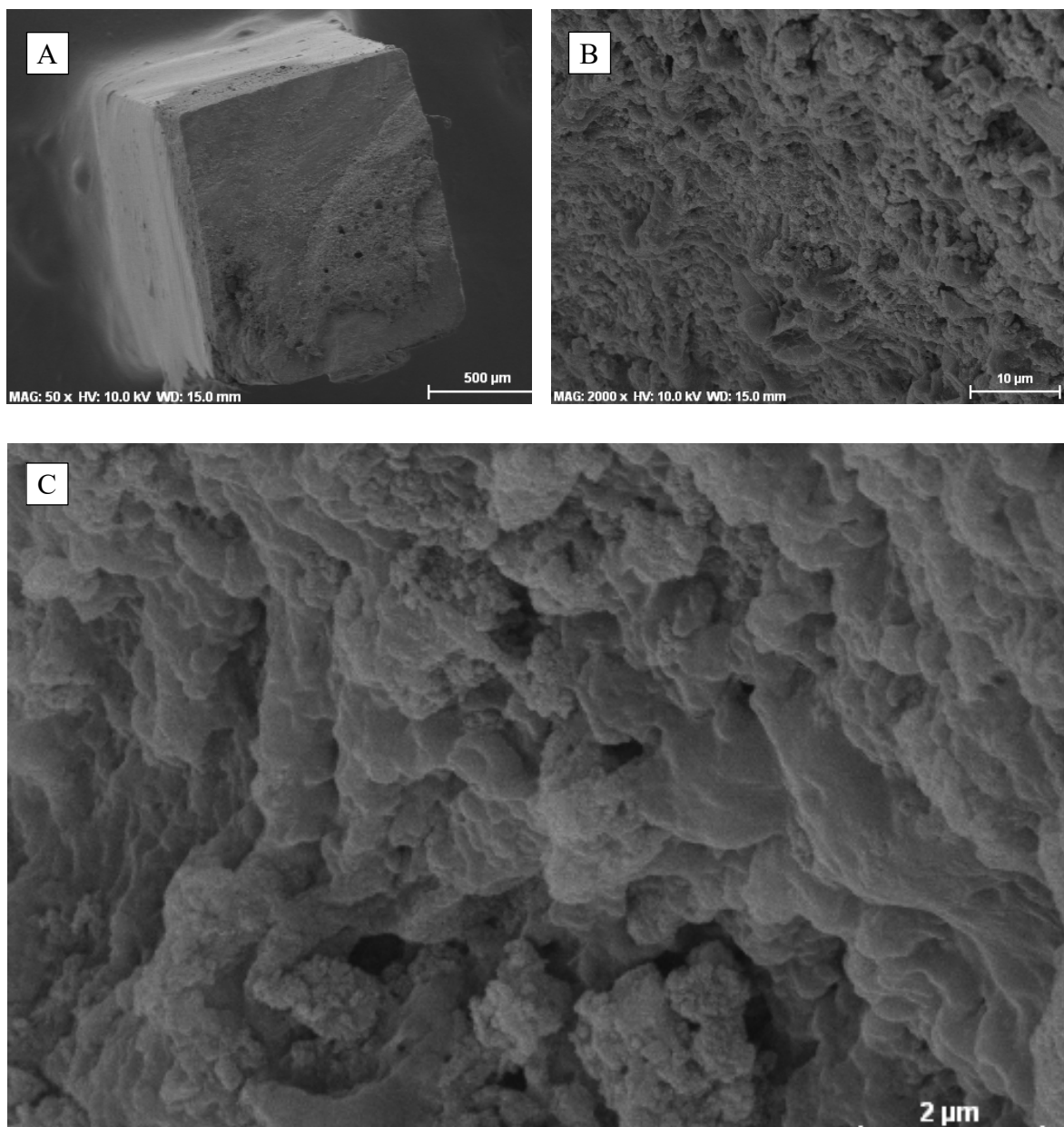


Fig. 30. CIVMR-T1.

A. Microfotografía MEB (Magnificación 50x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde apreciamos una fractura cohesiva que deja un sustrato más o menos homogéneo.

B: Microfotografía MEB (Magnificación 2.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde observamos la DAC cubierta por restos del material.

C: Microfotografía MEB (Magnificación 1.0000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), donde confirmamos la protección del colágeno por el material, es excepcional que quedara expuesto aún después de un período largo de almacenamiento.

4.1.2.4 EXP-ER.

A T0 se encontraron fracturas mixtas, detectamos el material cubriendo parte de la dentina, aunque había otra parte no recubierta, también veíamos túbulos dentinarios obturados con el material (Figs. 31A-31B). A 2000x se pudo apreciar claramente una cantidad mínima de colágeno sin infiltrar, así como la dentina peritubular obturada con tags resinosos (Fig. 31C). Se confirmó una buena infiltración por parte del adhesivo y que la fractura ocurrió en la base de la DAC.

A T1 también encontramos fracturas predominantemente mixtas, observamos la DAC cubierta por restos del material y muchos minerales (Figs. 32A-32B). A un aumento de 2.000x se puso de manifiesto la protección de la DAC por el material, al igual que la presencia de muchos minerales después de un largo período de almacenamiento (Fig. 32C). A 5.000x confirmamos que el colágeno siempre se encontraba cubierto por minerales (Fig. 32D).

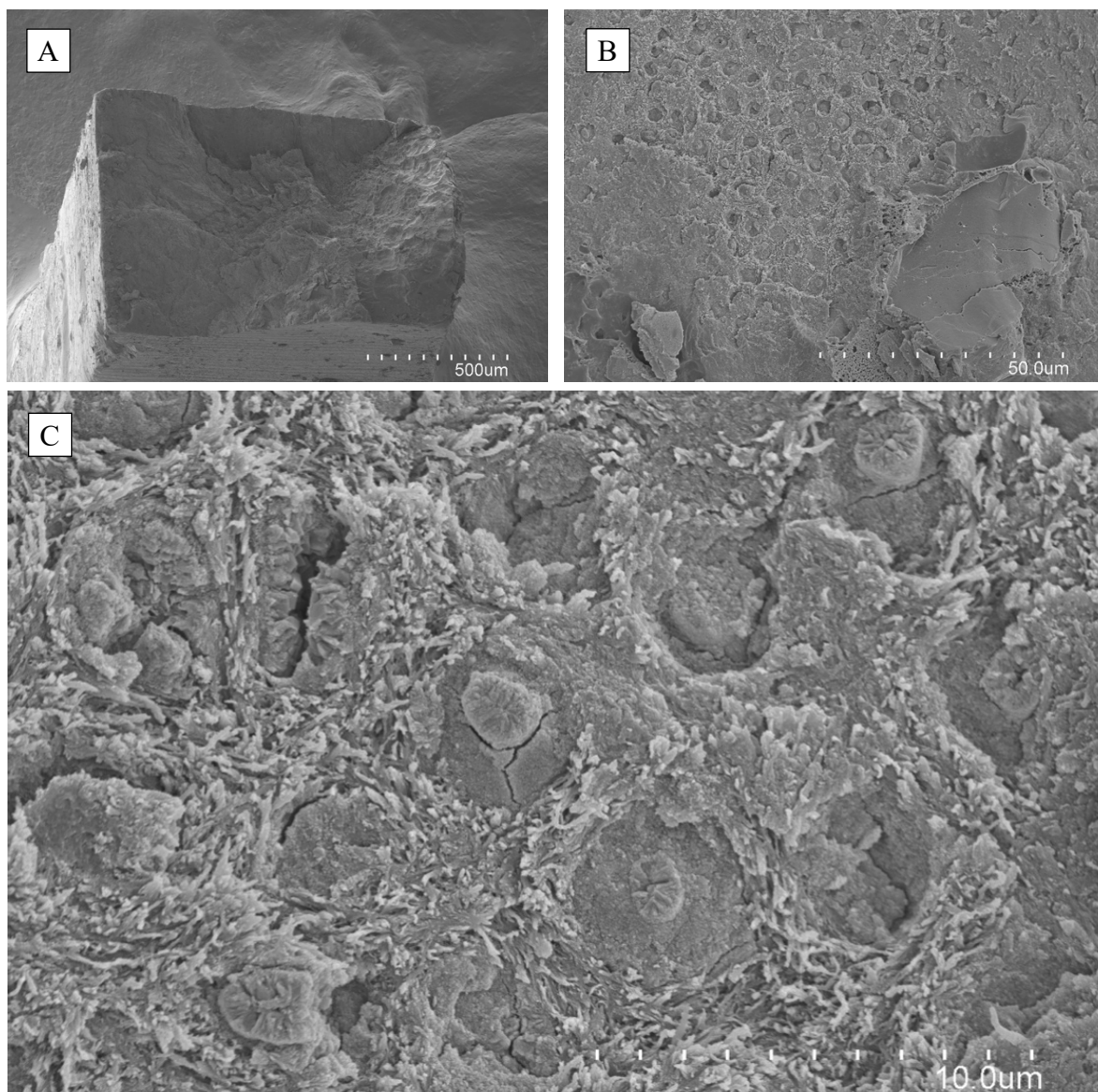


Fig. 31. EXP-ER-T0.

A: Microfotografía MEB (Magnificación 50x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde apreciamos una fractura mixta.

B: Microfotografía MEB (Magnificación 500x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde observamos el material cubriendo parte de la dentina, otra parte no está recubierta, también apreciamos túbulos dentinarios obturados con el material.

C: Microfotografía MEB (Magnificación 2.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), se aprecia claramente una cantidad mínima de colágeno intertubular sin infiltrar, así como la dentina peritubular obturada con tags resinosos. Se confirma una buena infiltración por parte del adhesivo y que la fractura ocurrió en la base de la DAC.

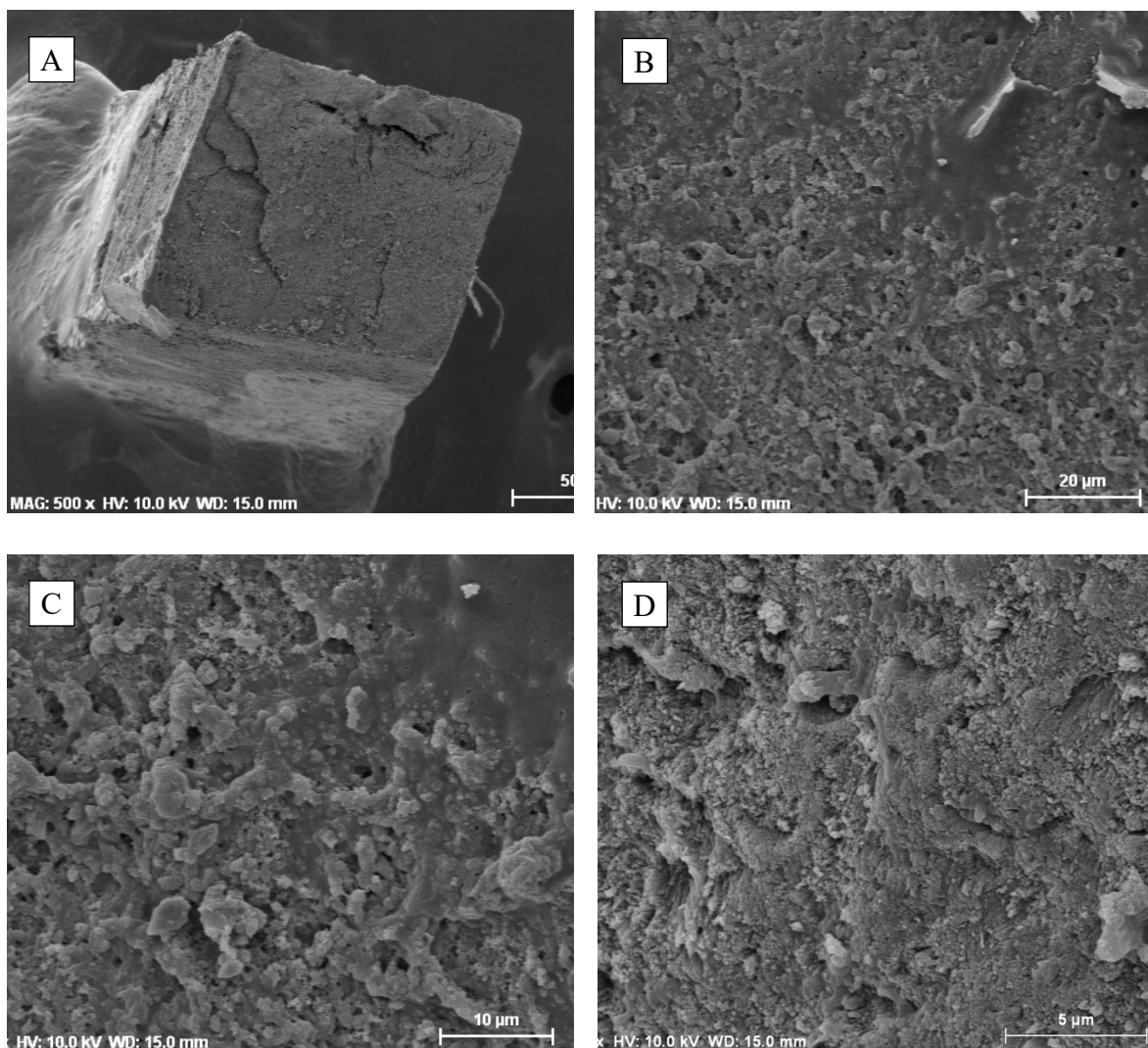


Fig. 32. EXP-ER-T1.

- A: Microfotografía MEB (Magnificación 50x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde apreciamos una fractura mixta que deja un sustrato más o menos homogéneo con alguna delaminación.*
- B: Microfotografía MEB (Magnificación 1.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), observamos la DAC cubierta por restos del material y muchos minerales. Se trata de una fractura mixta.*
- C: Microfotografía MEB (Magnificación 2.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), donde se pone de manifiesto la protección de la DAC por el material y la presencia de muchos minerales después de un largo período de almacenamiento.*
- D: Microfotografía MEB (Magnificación 5.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), donde confirmamos que el colágeno siempre está recubierto por una gran cantidad minerales.*

4.1.2.5 EXP-SE.

A T0 identificamos igualmente fracturas mixtas (Fig. 33A). Apreciábamos el material cubriendo la DAC, así como túbulos dentinarios obturados, aunque algunos permanecían vacíos. A un aumento de 2.000x se confirmaba la DAC cubierta por el material, y no detectamos la presencia de fibrillas colágenas en la dentina peri e intertubular (Fig.33B). En la Fig. 33C se confirmó una buena penetración del adhesivo.

A un aumento de 10.000x llegamos a identificar claramente la presencia de resina residual con muchas porosidades, probablemente causadas por una incompleta evaporación de los agentes biomiméticos (Fig. 33D).

A T1 teníamos igualmente la DAC cubierta por restos del material, vemos en laS Figs.34A-34B, que se trataba claramente de una fractura mixta. A un aumento de 5.000x se puso de manifiesto la protección de la DAC por el material, aunque detectamos áreas donde se encontraba la dentina expuesta sin presencia de colágeno, probablemente degradado, después de un largo período de almacenamiento (Fig. 34C). A 10.000x pudimos confirmar la presencia de minerales que recubrían la DAC (Fig.34D).

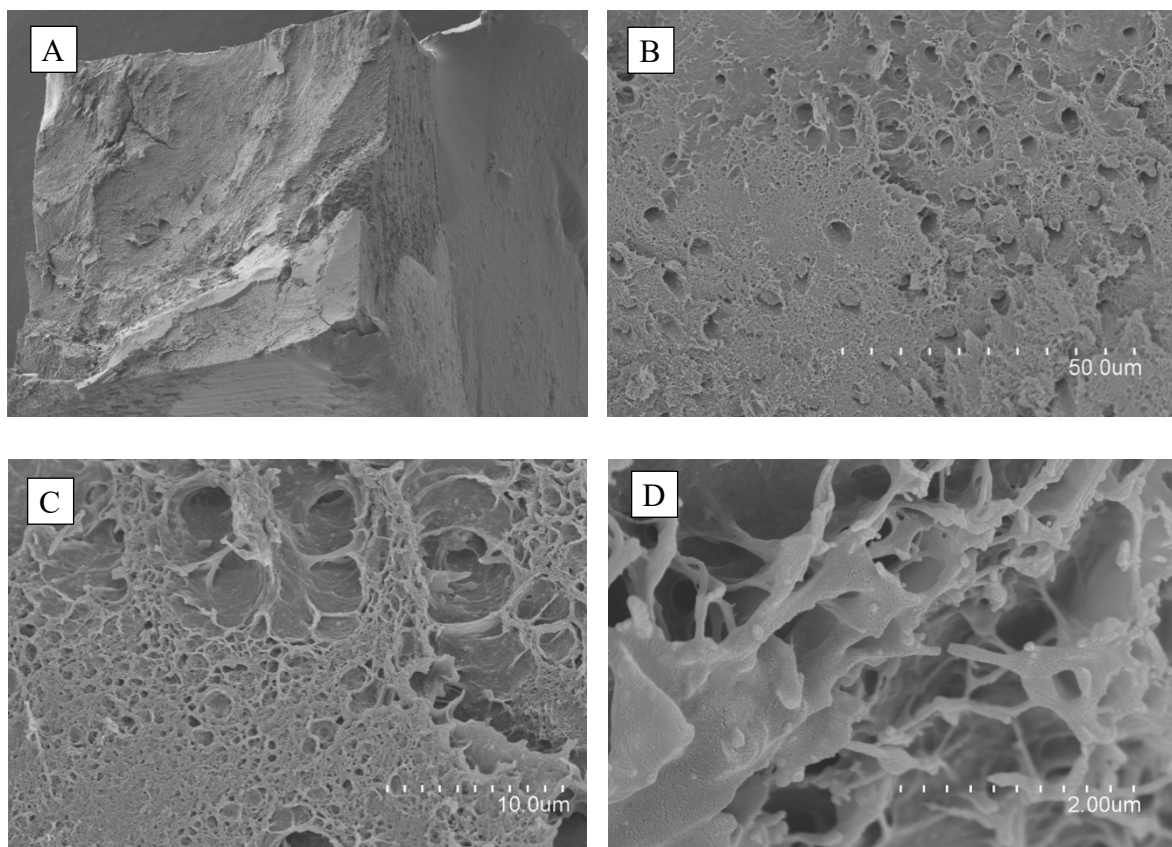


Fig. 33. EXP-SE-T0.

A: Microfotografía MEB (Magnificación 50x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde apreciamos una fractura mixta.

B: Microfotografía MEB (Magnificación 500x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde observamos el material cubriendo la DAC, así como túbulos dentinarios obturados con el material, y otros vacíos.

C: Microfotografía MEB (Magnificación 2.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), se confirma la DAC cubierta por el material, y no hay presencia de fibrillas colágenas en la dentina peri e intertubular. Esta imagen muestra una buena penetración del adhesivo.

D: Microfotografía MEB (Magnificación 10.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), confirmamos la presencia de resina residual con muchas porosidades, probablemente causadas por una incompleta evaporación de los agentes biomiméticos.

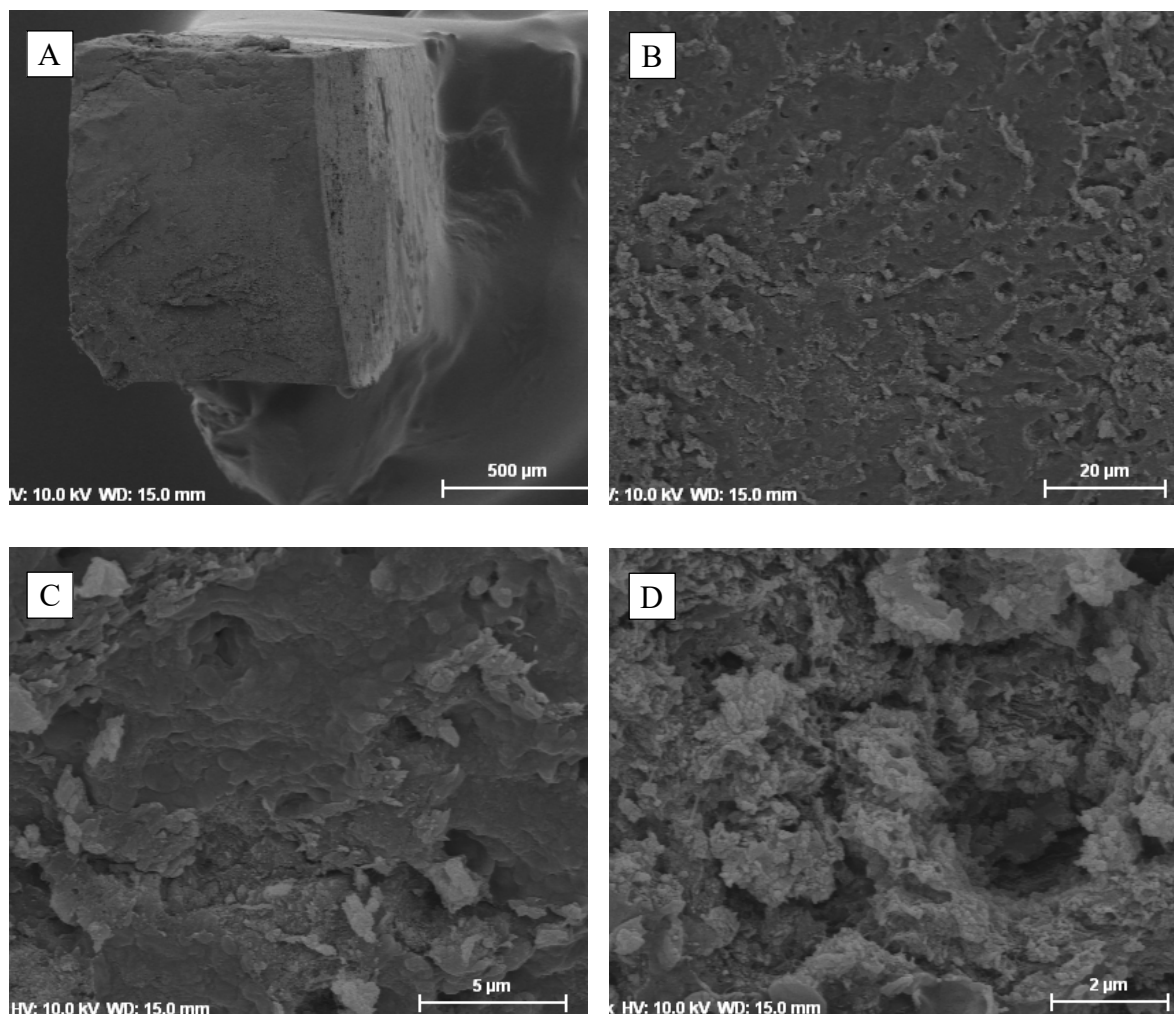


Fig. 34. EXP-SE-T1.

A. Microfotografía MEB (Magnificación 50x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm) donde apreciamos una fractura mixta que también deja un sustrato bastante homogéneo.

B: Microfotografía MEB (Magnificación 1.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), observamos la DAC cubierta igualmente por restos del material. Se trata de una fractura mixta.

C: Microfotografía MEB (Magnificación 5.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), donde se pone de manifiesto la protección de la DAC por el material, aunque detectamos áreas donde se encuentra la dentina expuesta sin presencia de colágeno, probablemente degradado, después de un largo período de almacenamiento.

D: Microfotografía MEB (Magnificación 10.000x HV 10.0 kV WD: 15.0 mm), donde confirmamos la presencia de minerales que recubren la DAC.

4.1.3 Microanálisis MEB-EDX.

La concentración atómica relativa es la variable dependiente de interés en este estudio. Por tanto, lo que se va a evaluar, es si el peso relativo del P y Ca, ratio Ca/P en este conjunto de 6 minerales, cambia de T0 a T1, y si hay diferencias entre los diferentes grupos.

La muestra disponible para este estudio se resume en la tabla T6:

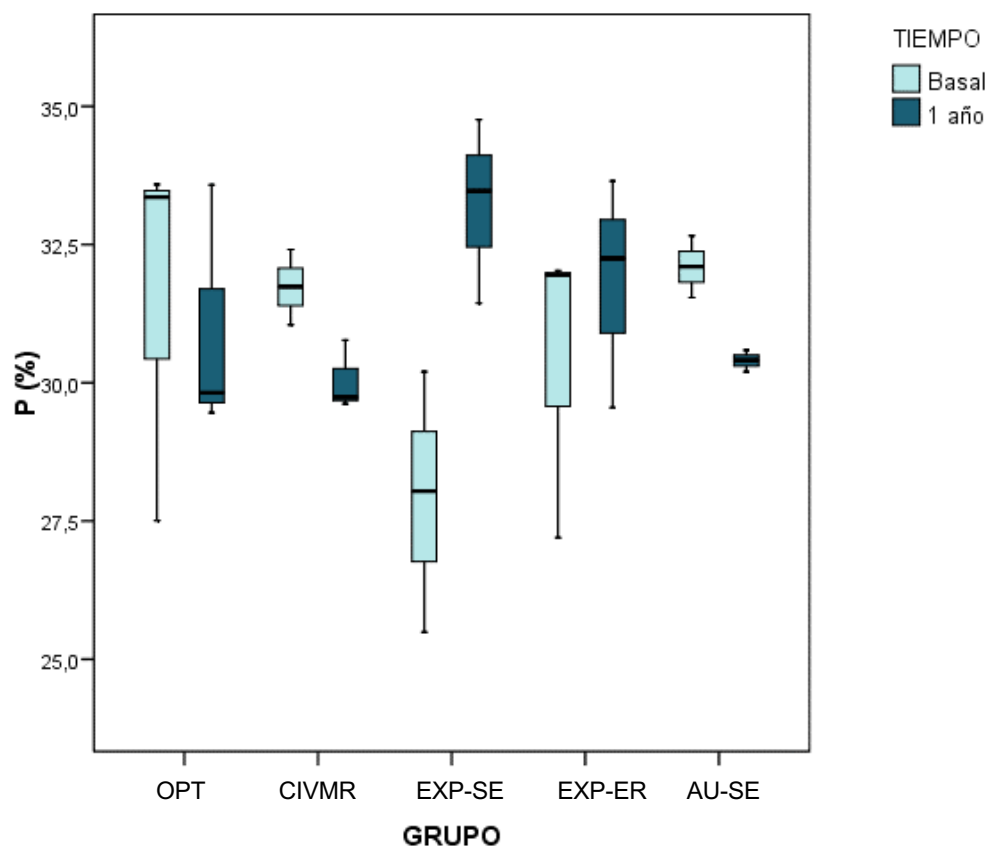
T6-MUESTRAS VÁLIDAS PARA ESTUDIO DE REMINERALIZACIÓN: GRUPO Y TIEMPO.

	TIEMPO					
	Total		Basal		1 año	
	N	%	N	%	N	%
Total	30	100,0%	15	50,0%	15	50,0%
OPT	6	20,0%	3	10,0%	3	10,0%
CIVMR	6	20,0%	3	10,0%	3	10,0%
EXP-SE	6	20,0%	3	10,0%	3	10,0%
EXP-ER	6	20,0%	3	10,0%	3	10,0%
AU-SE	6	20,0%	3	10,0%	3	10,0%

Peso relativo de fósforo (T0-T1).

De cara al análisis, hay que tener en cuenta que 3 muestras por grupo y tiempo es un tamaño demasiado pequeño para que las pruebas estadísticas tengan suficiente potencia. Por ejemplo, la media podría estar muy distorsionada por algún valor extremo en el conjunto de 3. La mediana no deja de ser el valor central de los 3.

La distribución en el gráfico de box-plot simplemente localiza el valor central (la mediana) y los 2 extremos del bigote, que son el mínimo y el máximo de la distribución.

P (FÓSFORO).

Es importante profundizar en el análisis visual descriptivo de las distribuciones (por la previsible falta de potencia de los análisis posteriores). Los valores de concentración de P tienden a bajar en todos los grupos excepto los 2 grupos EXP.

T3.2.1-CONCENTRACIÓN (%) DE FÓSFORO (P) SEGÚN GRUPO POR TIEMPO DE ENSAYO: resultados test Kruskal-Wallis.

	<u>p-valor</u>
<u>En TIEMPO=0</u>	<u>0,252</u>
<u>En TIEMPO=1</u>	<u>0,331</u>

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

No hay suficiente evidencia estadística en cuanto a diferencias a T0 y T1.

T3.2.1B-HOMOGENEIDAD DE CONCENTRACIÓN (%) DE FÓSFORO (P) EN T0**SEGÚN GRUPO:** resultados pruebas Mann-Whitney.

	OPT	CIVMR	EXP-SE	EXP-ER
OPT				
CIVMR	0,700			
EXP-SE	0,400	0,100		
EXP-ER	0,400	1,000	0,400	
AU-SE	0,700	0,700	0,100	0,400

*p<0,005; **p<0,001; ***p<0,0001

Aunque no hay significancia estadística, obsérvense las discrepancias entre EXP-SE frente a CIVMR y AU-SE. Básicamente el EXP tiene un nivel basal de P muy inferior al de los otros 2 materiales.

T3.2.1C-HOMOGENEIDAD DE CONCENTRACIÓN (%) DE FÓSFORO (P) EN T1**SEGÚN GRUPO:** resultados pruebas Mann-Whitney.

	OPT	CIVMR	EXP-SE	EXP-ER
OPT				
CIVMR	1,000			
EXP-SE	0,400	0,100		
EXP-ER	0,700	0,700	0,700	
AU-SE	0,700	0,700	0,100	0,700

*p<0,005; **p<0,001; ***p<0,0001

También, sin significancia estadística, es remarcable la elevada concentración de P en EXP-SE en comparación a la del CIVMR y AU-SE.

Recíprocamente podríamos preguntarnos si hay cambios de concentración a lo largo del año dentro de cada adhesivo.

T3.2.2-HOMOGENEIDAD DE CONCENTRACIÓN (%) DE FÓSFORO (P) SEGÚN TIEMPO POR GRUPO: resultados test Mann-Whitney.

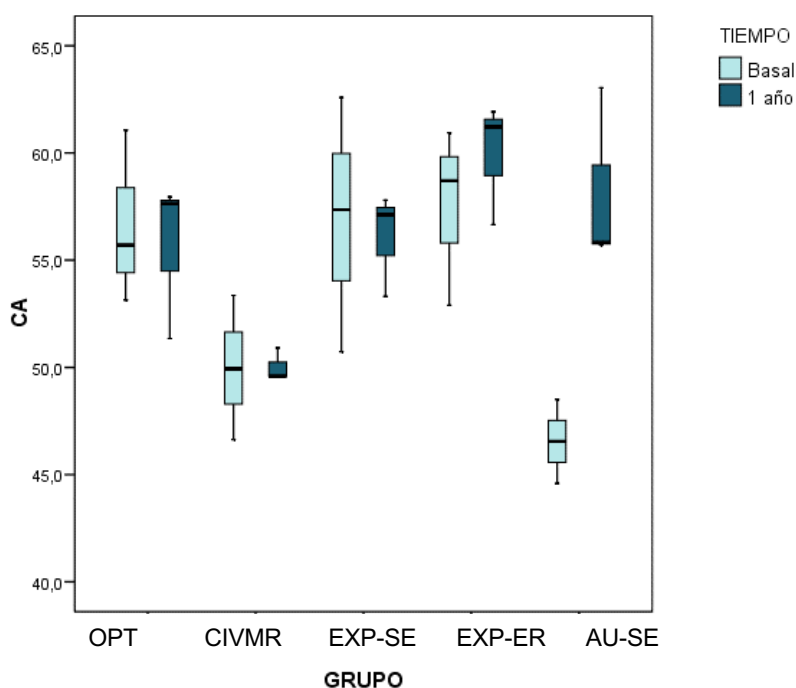
	<u>p-valor</u>
<u>En OPT</u>	<u>1,000</u>
<u>En CIVMR</u>	<u>0,100</u>
<u>En EXP-SE</u>	<u>0,100</u>
<u>En EXP-ER</u>	<u>0,400</u>
<u>En AU-SE</u>	<u>0,100</u>

*p<0,01; **p<0,005; ***p<0,0005

Sin diferencias significativas, la batería de pruebas resuelve un fuerte aumento de la concentración de P en el grupo EXP-SE y una fuerte disminución en CIVMR y AU-SE a T1.

Peso relativo de calcio (T0-T1).

Ca (CALCIO).



Lo más destacable es el gran aumento de la concentración de Ca con el material AU-SE.

T3.2.3-CONCENTRACIÓN (%) DE CALCIO (CA) SEGÚN GRUPO POR TIEMPO**DE ENSAYO:** resultados test Kruskal-Wallis.

	p-valor
En TIEMPO=0	0,065
En TIEMPO=1	0,100

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

No hay suficiente evidencia estadística de diferencias en T0 ni en T1; pero es destacable la fuerte tendencia en T0 (probablemente los valores tan bajos del AU-SE).

T3.2.3B-HOMOGENEIDAD DE CONCENTRACIÓN (%) DE CALCIO (CA) EN T0**SEGÚN GRUPO:** resultados pruebas Mann-Whitney.

	OPT	CIVMR	EXP-SE	EXP-ER
OPT				
CIVMR	0,200			
EXP-SE	1,000	0,200		
EXP-ER	1,000	0,200	1,000	
AU-SE	0,100	0,200	0,100	0,100

*p<0,005; **p<0,001; ***p<0,0001

En efecto, los p-valores más bajos corresponden a las comparaciones entre AU-SE y el resto.

T3.2.3C-HOMOGENEIDAD DE CONCENTRACIÓN (%) DE CALCIO (CA) EN T1**SEGÚN GRUPO:** resultados pruebas Mann-Whitney.

	OPT	CIVMR	EXP-SE	EXP-ER
OPT				
CIVMR	0,100			
EXP-SE	1,000	0,100		
EXP-ER	0,400	0,100	0,400	
AU-SE	1,000	0,100	1,000	0,700

*p<0,005; **p<0,001; ***p<0,0001

También sin significancia, el CIVMR exhibe valores más bajos que el resto. Recíprocamente también nos podríamos preguntar si hay cambios de concentración a lo largo del año dentro de cada adhesivo.

T3.2.4-HOMOGENEIDAD DE CONCENTRACIÓN (%) DE CALCIO (CA) SEGÚN**TIEMPO POR GRUPO:** resultados test Mann-Whitney.

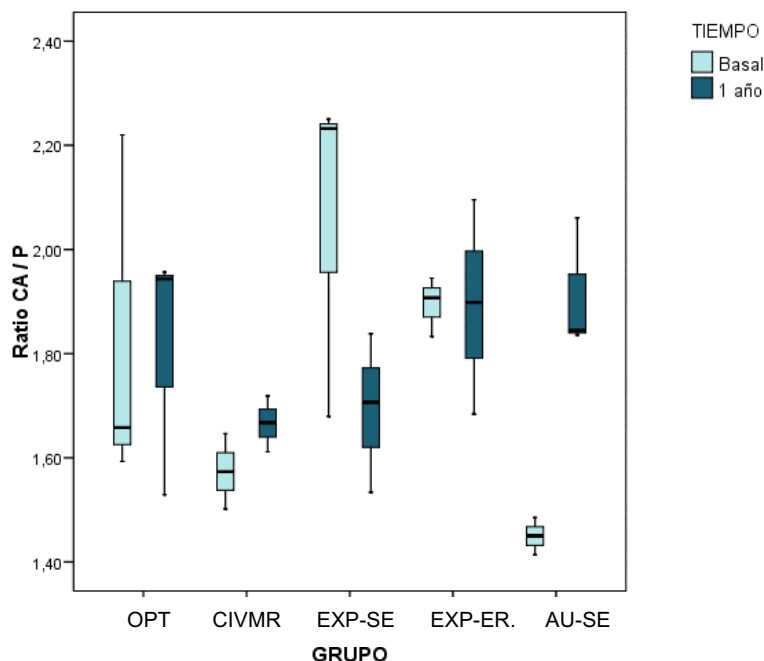
	p-valor
En OPT	1,000
En CIVMR	1,000
En EXP-SE	1,000
En EXP-ER	0,400
En AU-SE	0,100

*p<0,01; **p<0,005; ***p<0,0005

Sin diferencias significativas, se concluye un evidente incremento del Ca en el grupo AU-SE.

RATIO Ca/P

Esta ratio es el cociente entre las proporciones relativas de Ca y P (o lo que es igual, entre los porcentajes o concentraciones utilizadas en el apartado anterior).



Como consecuencia de los cambios de concentración de cada uno de los elementos ya comentados en los análisis anteriores, se destacó:

- Una fuerte disminución de la ratio en el grupo EXP-SE, ya que el P aumentó considerablemente. Este resultado de ratio de 1.7 a T1, es compatible con la formación de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $\text{Ca/P} = 1.667$). (97).
- Un fuerte incremento de la ratio en AU-SE, ya que Ca aumentó a la vez que el P se redujo.

T3.2.5-HOMOGENEIDAD DE RATIO CA / P SEGÚN GRUPO POR TIEMPO DE ENSAYO: resultados test Kruskal-Wallis.

	p-valor
En TIEMPO=0	0,024*
En TIEMPO=1	0,351

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Hemos de destacar que a T0 puede hablarse de diferencias significativas entre el conjunto de 5 grupos (p=0,024).

T3.2.5B-HOMOGENEIDAD DE RATIO CA / P EN T0 SEGÚN GRUPO: resultados pruebas Mann-Whitney.

	OPT	CIVMR	EXP-SE	EXP-ER
OPT				
CIVMR	0,200			
EXP-SE	0,200	0,100		
EXP-ER	0,700	0,100	0,700	
AU-SE	0,100	0,100	0,100	0,100

*p<0,005; **p<0,001; ***p<0,0001

En efecto, los p-valores más bajos corresponden a las comparaciones entre AU-SE y el resto. También el CIVMR presenta una ratio notablemente más baja que el resto.

A T1 no se detectaron diferencias; ya que en estos dos grupos se apreció un incremento de la ratio lo que condujo a una mayor homogeneización con el resto.

T3.2.5C-HOMOGENEIDAD DE RATIO CA/P EN T1 SEGÚN GRUPO: resultados pruebas Mann-Whitney.

	OPT	CIVMR	EXP-SE	EXP-ER
OPT				
CIVMR	0,700			
EXP-SE	0,700	1,000		
EXP -ER	1,000	0,200	0,400	
AU-SE	1,000	0,100	0,200	1,000

*p<0,005; **p<0,001; ***p<0,0001

4.1.4 Microdureza.

La tabla 8 resume la descriptiva al respecto para 54 zonas exploradas (9x6):

T8-MICRODUREZA SEGÚN EL ASPECTO DE LA DENTINA.

	ASPECTO								
	Total	amarilla	amarilla-marrón	amarilla-negra	marrón	marrón-clara	marrón-oscuro	marrón-gris	negra
N	54	9	1	1	6	9	13	2	13
Media	46,17	54,97	47,30	55,20	37,73	50,56	48,19	32,90	40,17
Desviación típica	12,63	5,69	.	.	6,11	9,17	18,36	,14	9,30
Mínimo	28,00	50,20	47,30	55,20	28,00	43,00	30,70	32,80	34,00
Máximo	90,00	68,70	47,30	55,20	44,30	68,80	90,00	33,00	64,00
Mediana	44,40	54,00	47,30	55,20	39,45	45,80	41,20	32,90	35,30

La mayoría de las distribuciones, se sitúan por encima del valor 33 VHN, presentan más dureza de la que teóricamente deberían tener (86) . Para corroborar este punto se ha estimado el intervalo de confianza al 95% para la mediana en las diferentes categorías de aspecto:

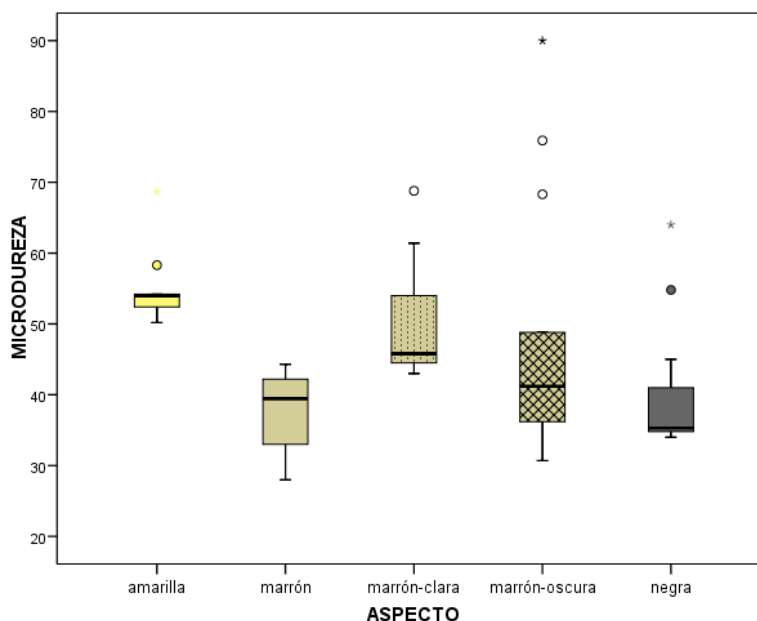
T3.3.1-MICRODUREZA SEGÚN ASPECTO DE LA DENTINA: intervalo de confianza al 95% para la mediana.

	<u>IC 95%</u>
<u>Amarilla</u>	<u>50,3 – 58,3</u>
<u>Marrón</u>	<u>28,0 – 44,3</u>
<u>Marrón-clara</u>	<u>43,0 – 61,4</u>
<u>Marrón-oscuro</u>	<u>34,3 – 68,3</u>
<u>Negra</u>	<u>34,4 – 45,0</u>

*p<0,01; **p<0,005; ***p<0,0005

Es decir, a excepción del grupo de zonas de la dentina con color marrón, bajo cualquier otro aspecto visual puede asegurarse que la mediana de la distribución estará por encima de 34,3 VHN con probabilidad 97,5%. Por tanto, se trata de una muestra de trabajo relativamente bien mineralizada. También podemos comparar los grupos más numerosos en cuanto a la variable “aspecto” se refiere, es decir: amarilla, marrón, marrón-clara, marrón-oscuro y negra.

Lo que se observa, desde el punto de vista descriptivo, es que la dureza medida presenta una lógica relación con el aspecto de la dentina. **A tonos más oscuros, la dureza disminuye.** La prueba estadística de Kruskal-Wallis confirma estas diferencias a nivel significativo (p=0,002).



4.1.5 Microscopía confocal.

4.1.5.1 AU-SE.

A T0 observamos una CH uniforme muy infiltrada por la fluoresceína. La DAC bajo la interfaz aparece muy porosa ya que existe una gran cantidad de señal (Fig. 35).

A T1 se puso de manifiesto la degradación bajo la CH, ya que la señal de fluorescencia en la DAC es notable, lo cual es compatible con un aumento en la porosidad y por tanto ausencia de remineralización (Fig. 36).

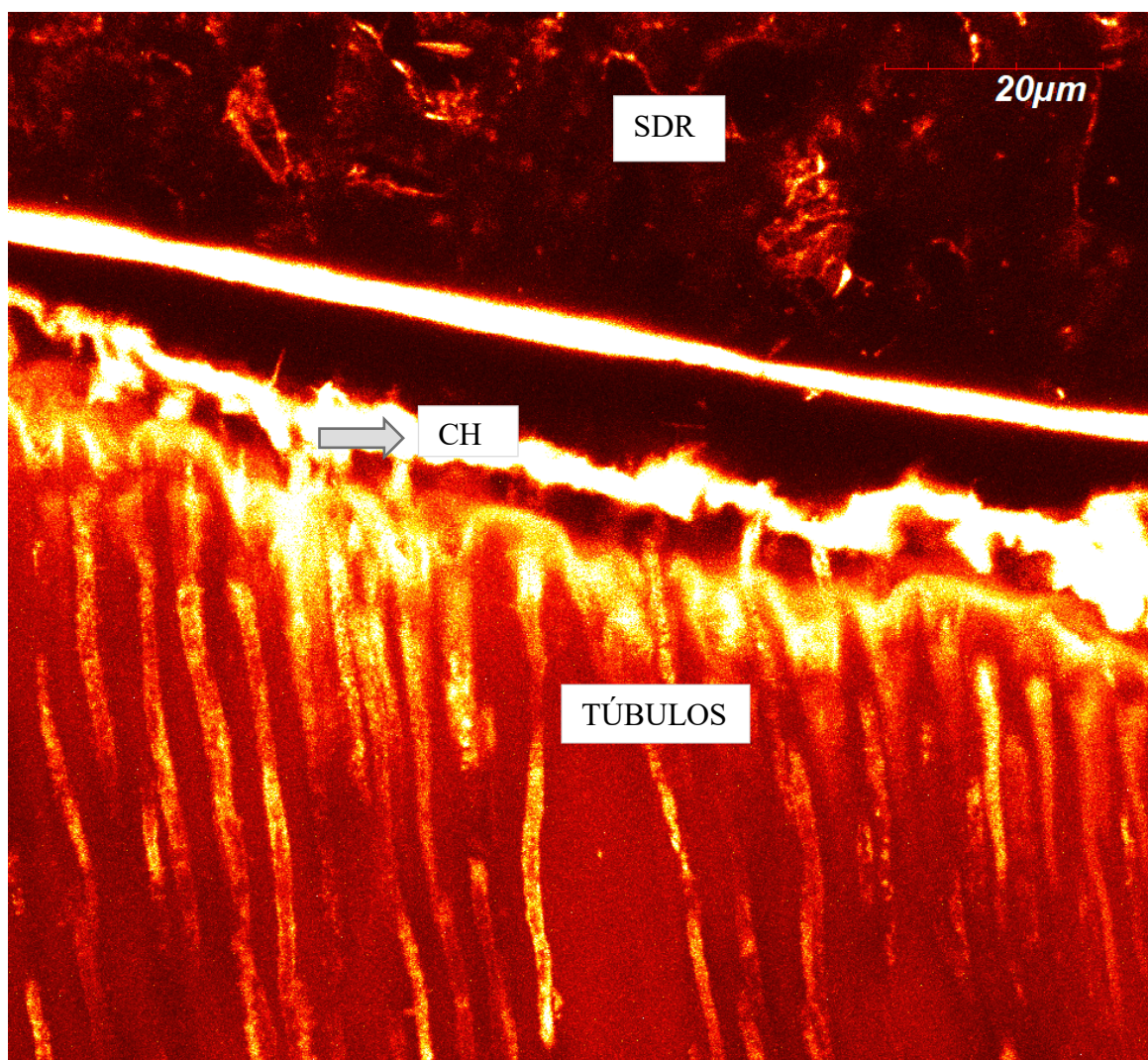


Fig. 35. AU-SE-T0.

Se observa una CH uniforme muy infiltrada por la fluoresceína. También la DAC debajo de la interfaz aparece muy porosa.

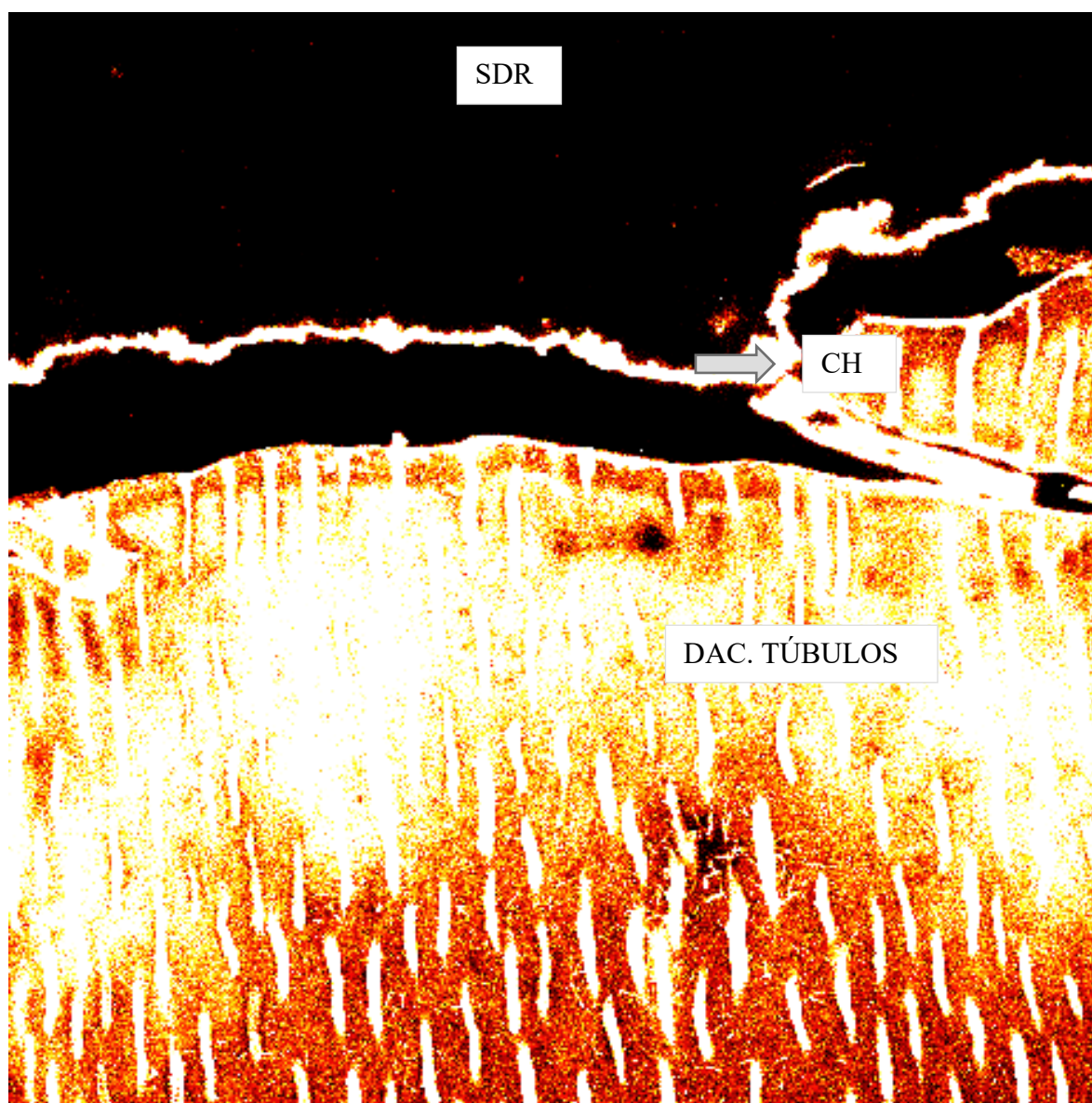


Fig. 36. AU-SE-T1.

Se observa degradación debajo de la CH, ya que la señal de fluorescencia en la DAC es muy destacable, lo cual es compatible con un aumento en la porosidad y por tanto ausencia de remineralización.

4.1.5.2 OPT.

A T0 se observó una CH uniforme muy infiltrada por la fluoresceína. También la DAC debajo de la interfaz aparece muy porosa, se aprecian claramente los túbulos con gran cantidad de señal (Fig. 37).

A T1 se puso de manifiesto igualmente la degradación y ausencia de remineralización, la señal de fluorescencia en la DAC fue también muy notable (Fig. 38).

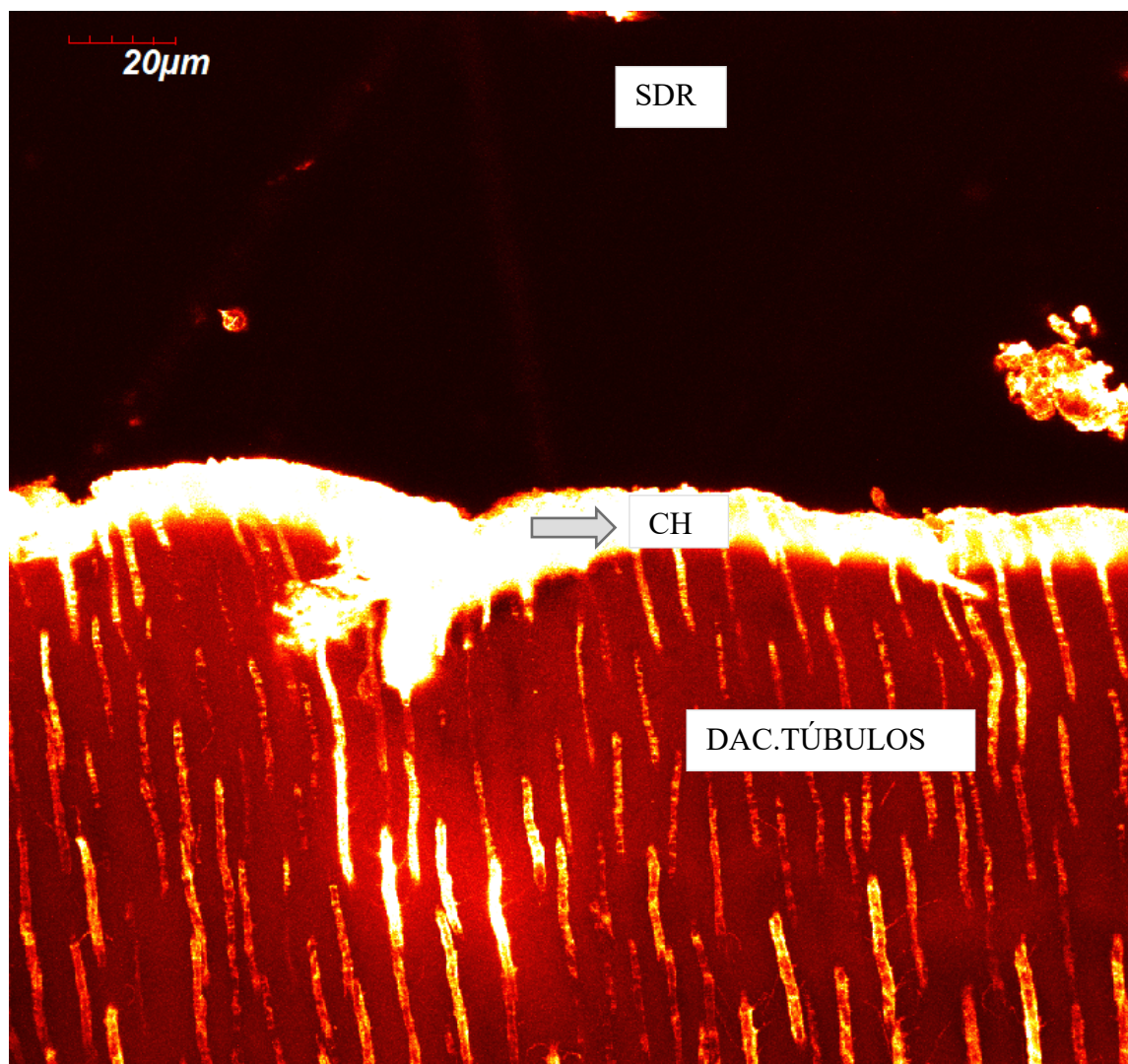


Fig. 37. OPT-T0.

Se observa una CH uniforme muy infiltrada por la fluoresceína. También la DAC debajo de la interfaz aparece muy porosa.

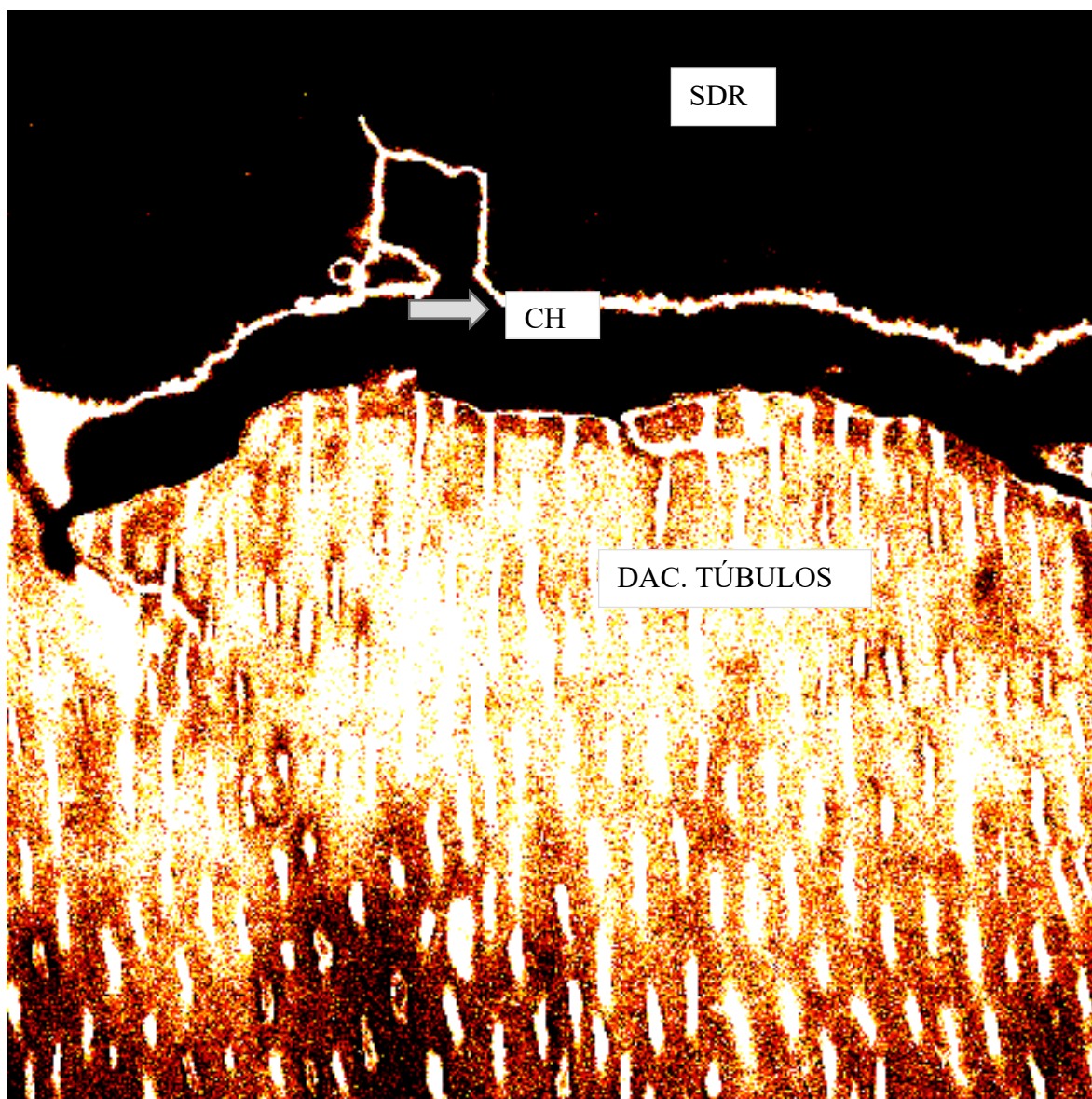


Fig. 38. OPT-T1.

Se observa igualmente degradación y ausencia de remineralización, la señal de fluorescencia en la DAC es muy importante.

4.1.5.3 CIVMR.

A T0 se observó como la fluoresceína infiltraba principalmente el CIVMR, y también la DAC bajo la interfaz (Fig.39).

A T1 aparecieron signos de remineralización porque la señal en la DAC era más baja, especialmente en la interfaz adhesiva, y sólo apareció alta intensidad fluorescente en los túbulos, pero a una distancia considerable desde la interfaz (Fig.40).

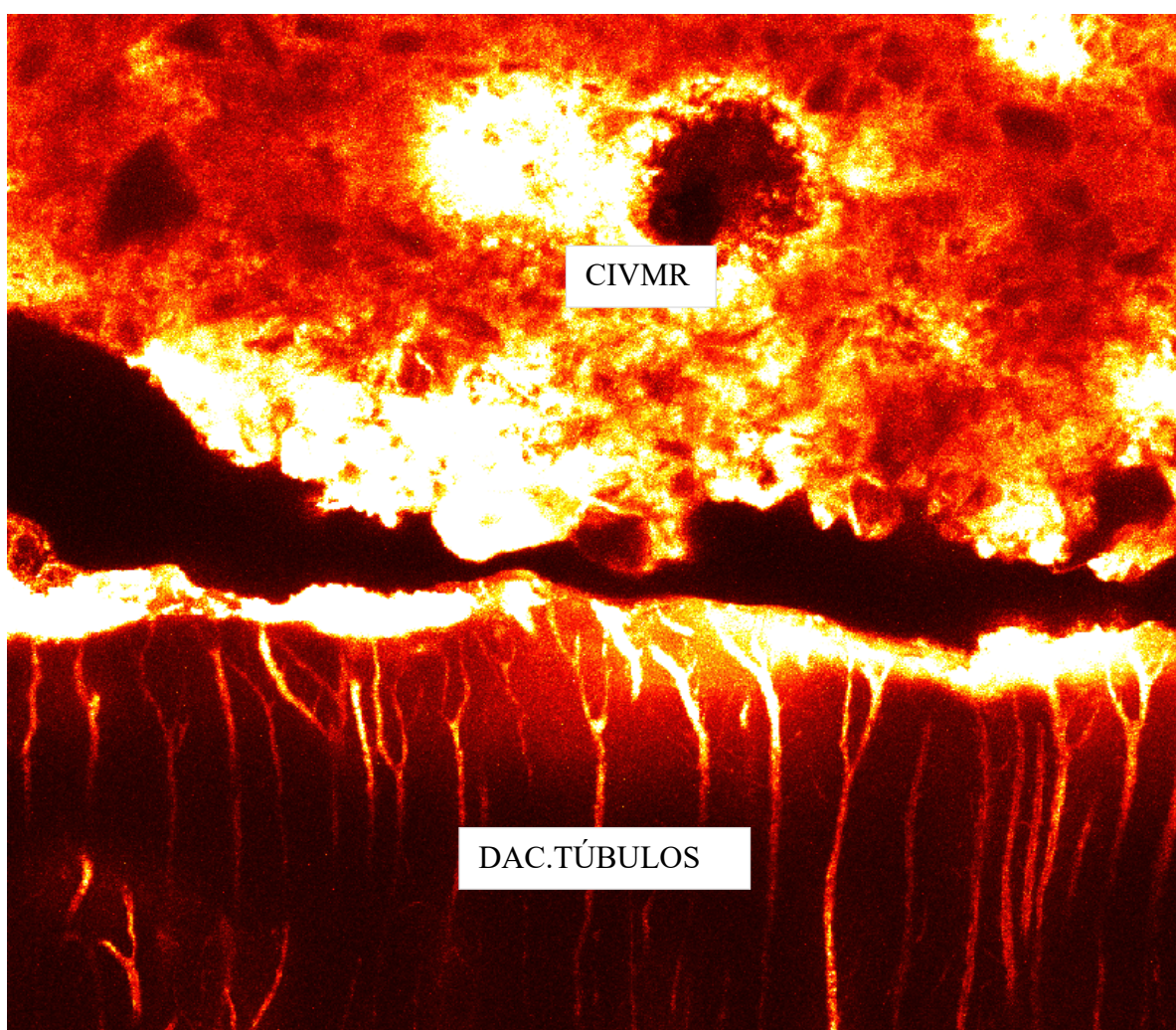


Fig. 39. CIVMR-T0.

Se observa como la fluoresceína infiltra principalmente CIVMR, y también la DAC bajo la interfaz.

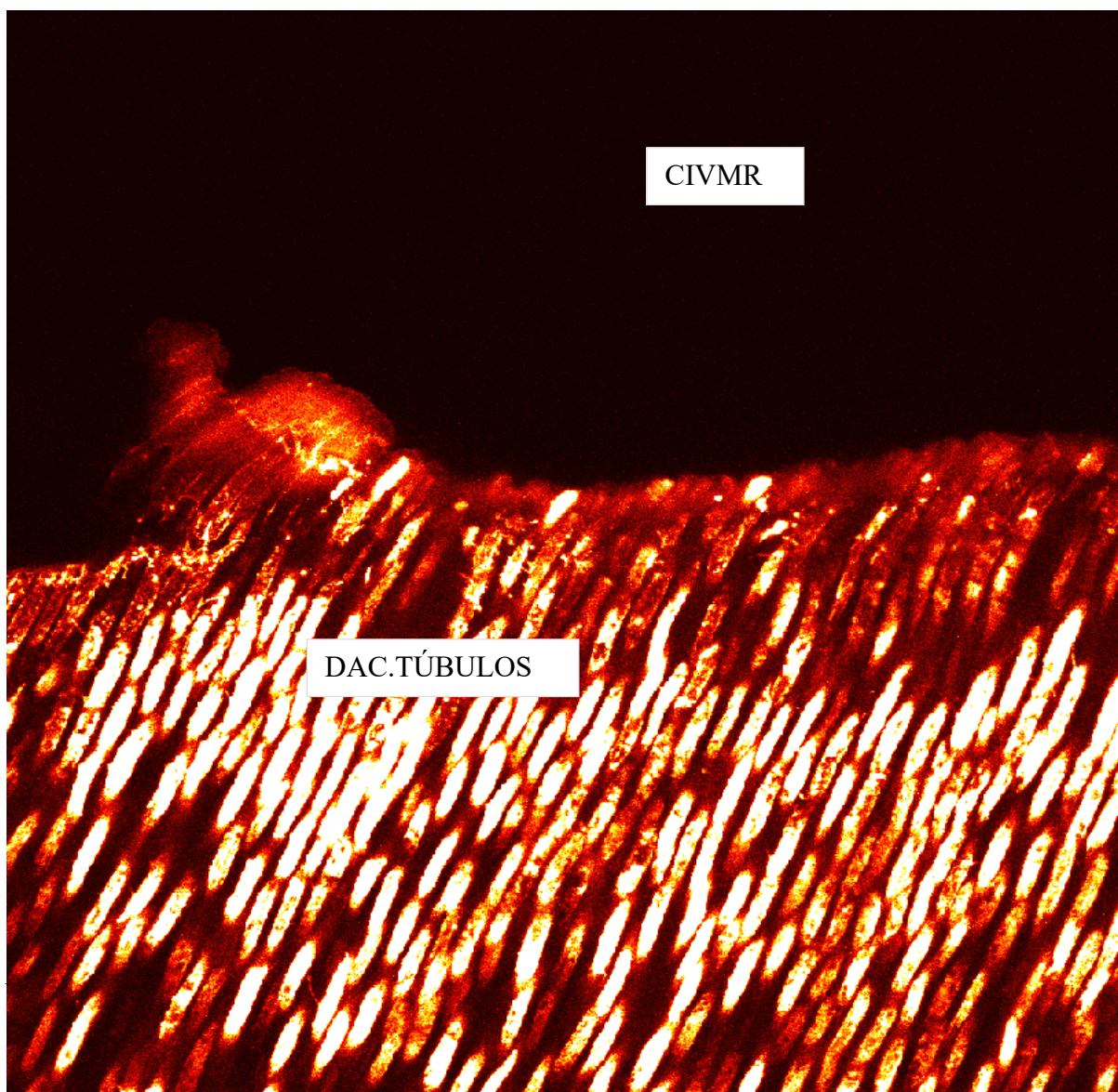


Fig. 40. CIVMR-T1.

Aparecen signos de remineralización porque la señal en la DAC es mas baja, especialmente en la interfaz adhesiva, y sólo aparece alta intensidad fluorescente en los túbulos, pero a una distancia importante desde la interfaz.

4.1.5.4 EXP-ER.

A T0 la dentina desmineralizada aparecía claramente infiltrada por la fluoresceína, lo cual indica porosidad. En la CH hay menos señal y por lo tanto deducimos menos porosidad por una buena infiltración del adhesivo (Fig.41).

A T1 la señal de fluorescencia era poco intensa y sólo se limitaba a los túbulos, al igual que en el caso de CIVMR, en la DAC apreciamos signos de remineralización. La CH no aparece, no sabemos a ciencia cierta si por degradación o que se ha remineralizado. Recordar por último que el SDR y el adhesivo no se distinguían porque no están dopados con ninguna sustancia fluorescente (Fig.42).

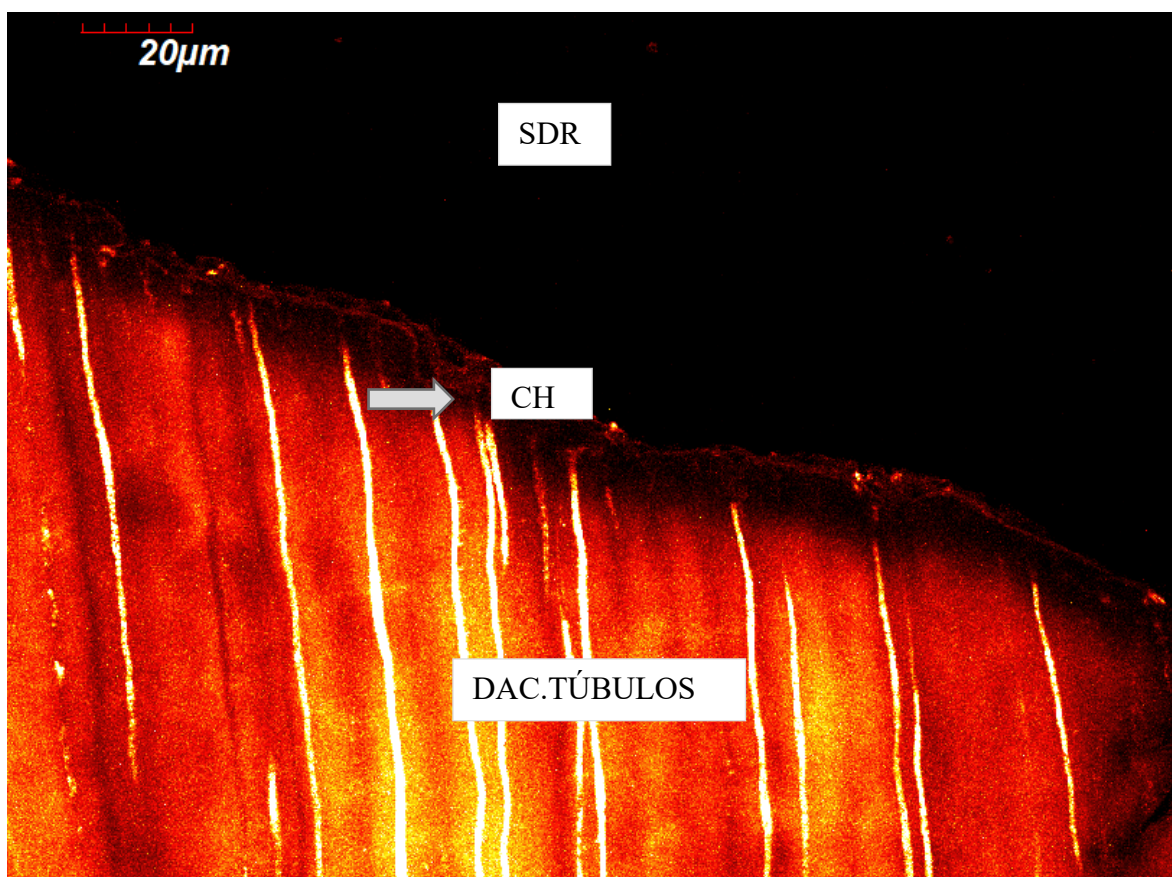


Fig. 41. EXP-ER-T0.

La dentina desmineralizada está claramente infiltrada por la fluoresceína, lo cual indica porosidad. En la CH hay menos señal, indica menos porosidad por infiltración del adhesivo.

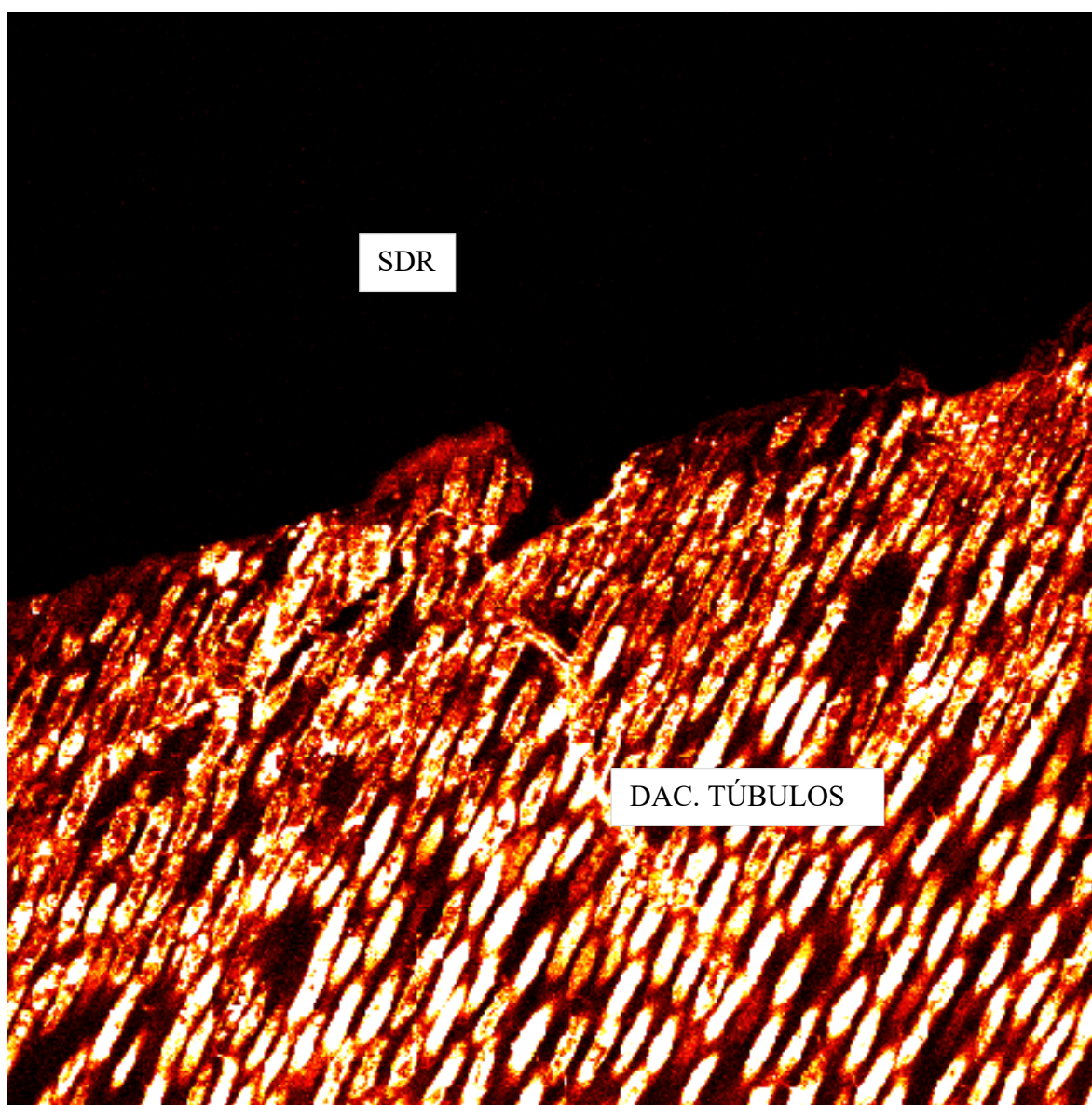


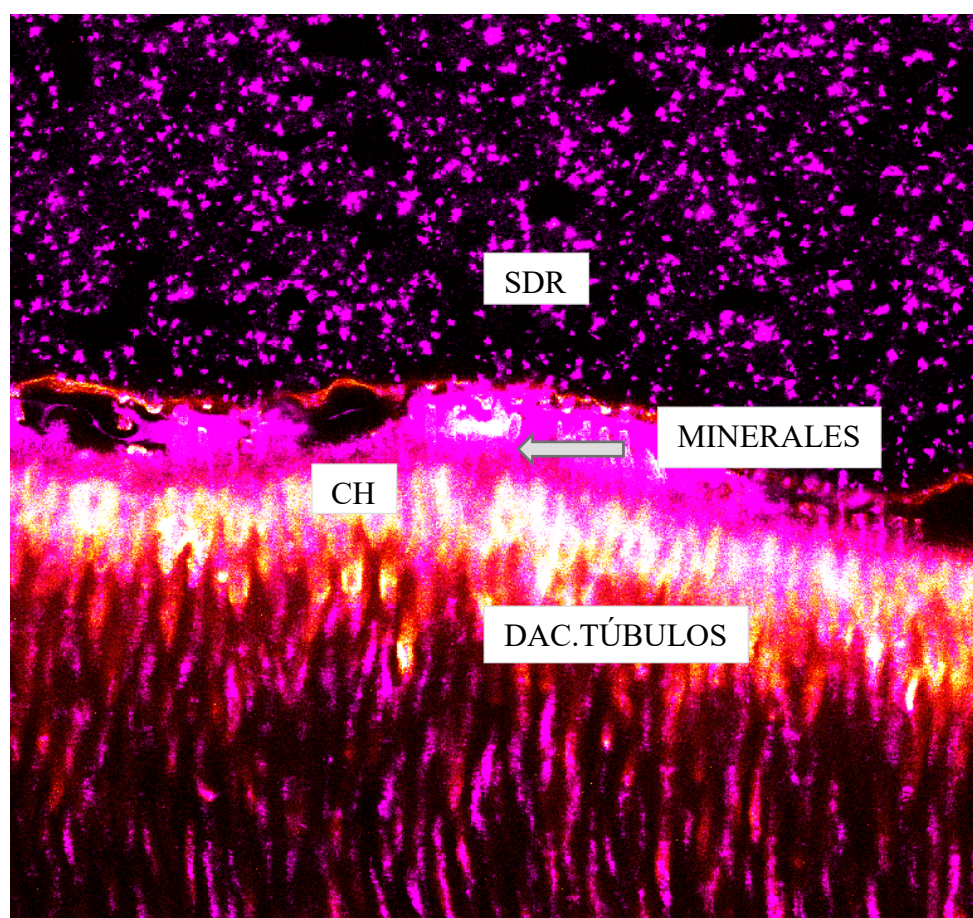
Fig. 42. EXP-ER-TI.

La señal de fluorescencia es poco intensa y sólo se limita a los túbulos, al igual que en el caso de CIVMR, en la DAC apreciamos signos de remineralización. la CH no aparece, no sabemos a ciencia cierta si por degradación o que se ha remineralizado. El SDR y el adhesivo no se ven porque no están dopados con ninguna sustancia fluorescente.

4.1.5.5 EXP-SE.

A T0 se observó claramente la fluorescencia de la DAC residual, pero con menor señal en la CH, por tanto, menos porosa quizás por los minerales aportados (azul en reflexión) desde el material (Fig.43).

A T1 destacamos la Fig.44, que representa en detalle la CH. La DAC apareció con signos claros de remineralización, en particular a nivel de la interfaz adhesiva (CH), debido a la baja señal. También se observó la presencia de un espacio vacío o “gap” en la CH, debido probablemente a un artefacto que se creó durante la preparación de la muestra. Hay que tener en cuenta que esta interfaz es bastante frágil a pesar de la presencia de minerales precipitados.



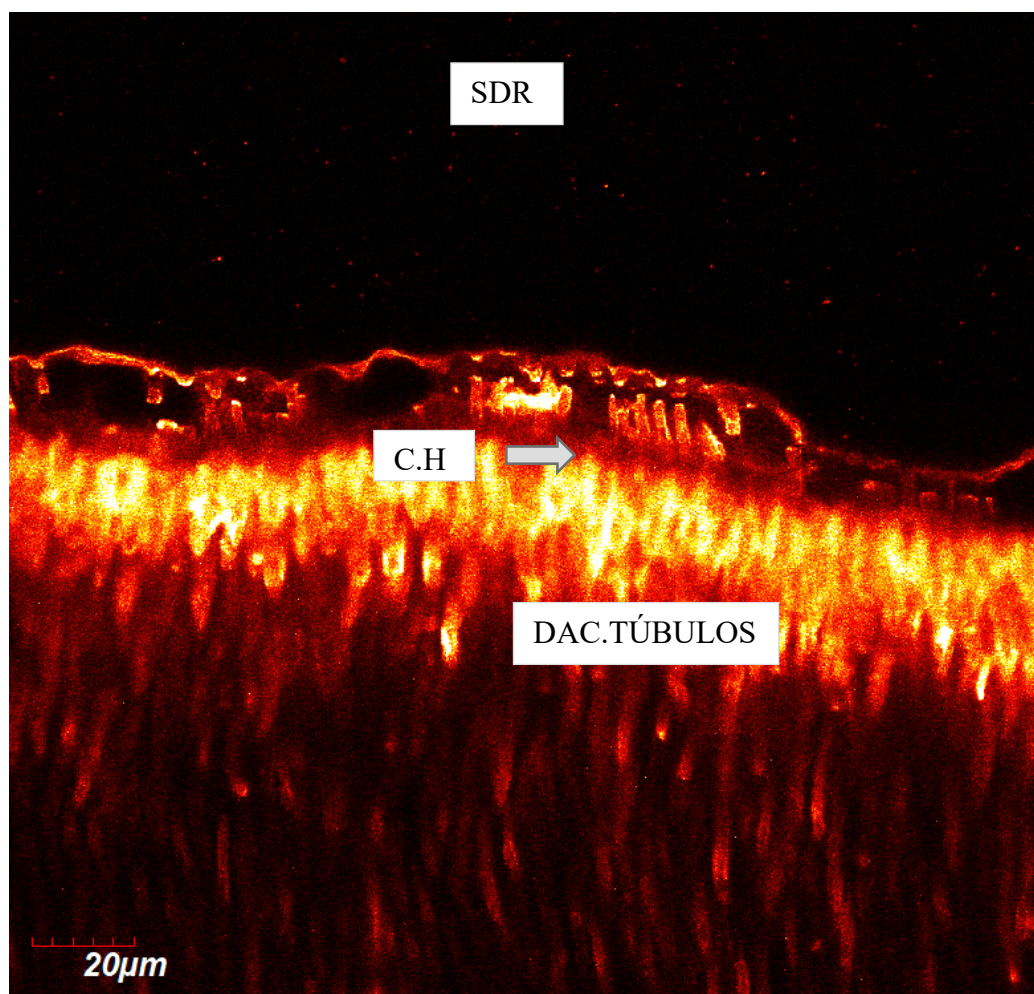


Fig. 43. EXP-SE-T0.

Se observa claramente la fluorescencia la DAC residual, pero con menor señal en la CH, por tanto, menos porosa quizás por los minerales aportados (azul – en reflexión) desde el material.

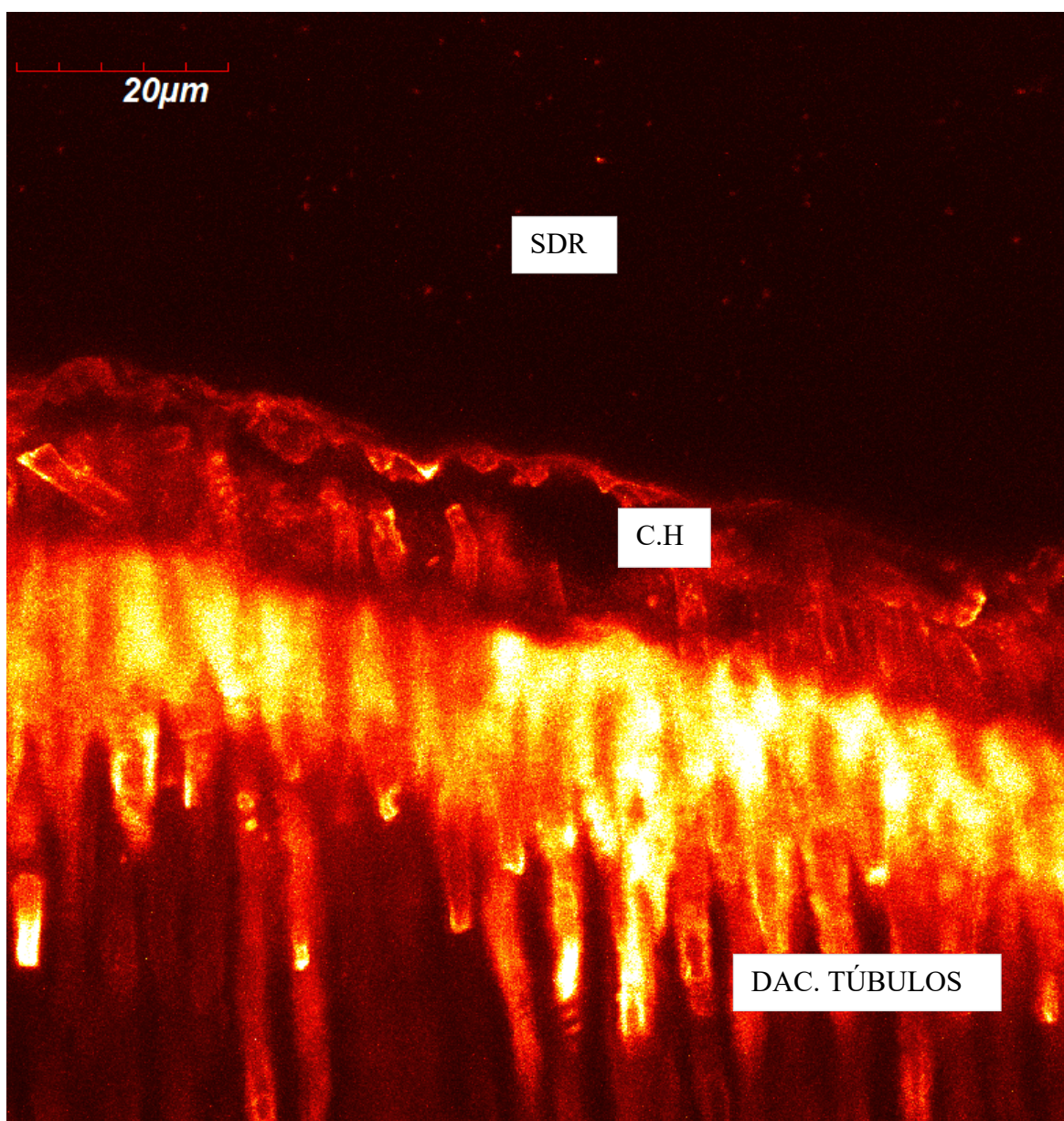


Fig. 44. EXP-SE-TI.

Esta imagen representa en detalle la CH. La DAC aparece con signos claros de remineralización, en particular a nivel de la interfaz adhesiva (CH), debido a la baja señal emitida. También se observa la presencia de un gap en la CH debido probablemente a un artefacto que se creó durante la preparación de la muestra. Hay que tener en cuenta que esta interfaz es frágil a pesar de la presencia de minerales precipitados.

4.2 DAC “artificial”.

4.2.1 Análisis microrradiográfico (MRT) y microdureza.

El análisis microrradiográfico mostró que la DAC “artificial” obtenida en las muestras con el protocolo D1, tenía una pérdida mineral media ΔZ [percentiles 25/75] de 3978 [3622/5266]% en volumen $\times \mu\text{m}$ y microdureza de 37.4 (30.0/45.4) VHN. Las muestras procesadas con el protocolo correspondiente al grupo D2, tenían 5.047 (4859/5569) % en volumen $\times \mu\text{m}$ y 31.9 (25.0/42.3) VHN. Mientras que las muestras del grupo D3 tenían 6649 (5991/8155) % en volumen $\times \mu\text{m}$ y 35.7 (25.9/43.6) VHN.

Después del período de remineralización, se observó que los cuatro materiales restauradores indujeron ganancia mineral, pero sin ninguna diferencia significativa entre los grupos ($p > 0.05$). Sin embargo, si se detectaron diferencias en la ganancia mineral entre los tipos de lesiones; Se observaron valores significativamente más altos en lesiones profundas inducidas por bacterias en comparación con lesiones superficiales o profundas inducidas químicamente (Fig..45A).

La microdureza sólo se incrementó selectivamente por los materiales restauradores. Por ejemplo, CIVMR no pudo aumentar la dureza independientemente del tipo de lesión (Fig..45B).

EXP proporcionó una ganancia de dureza significativa solo en las muestras del grupo D3. BIO y MTA aumentaron la dureza en todos los tipos de lesiones y éstos fueron significativamente superiores a CIVMR y EXP ($p < 0.05$).

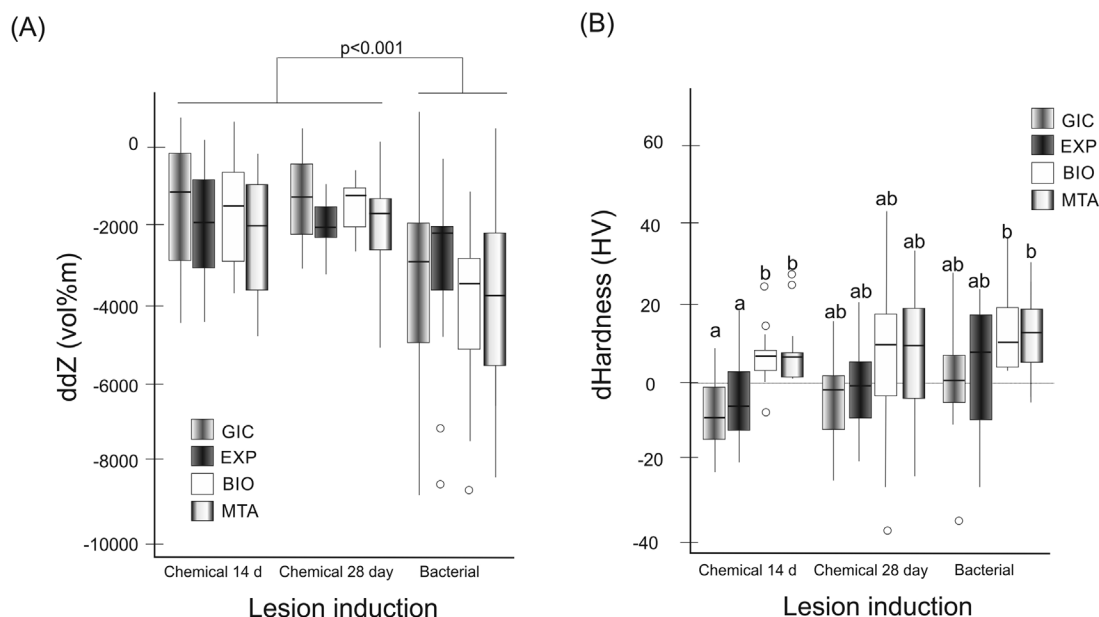


Fig. 45. Ganancias de minerales (A) y dureza (B) inducidas por los diferentes materiales (ANEXO I).

Se muestran las diferencias minerales absolutas (ddZ) y las diferencias de dureza (dHV) proporcionadas por el cemento de ionómero de vidrio modificado con resina RIVA (CIVMR o RMGIC que sería la abreviatura en inglés, aunque se ha publicado como GIC), el sistema adhesivo experimental (EXP), Biodentine (BIO) y el agregado de trióxido mineral (MTA) en comparación con la línea base. Se remineralizaron diferentes tipos de lesiones (D1: químico 14 días, D2: químico 28 días, D3: bacteriano). Hay que tener en cuenta que las ganancias minerales se indican mediante valores negativos (la pérdida mineral se redujo), mientras que las ganancias de dureza se indican mediante valores positivos (se aumentó la dureza). Las diferencias minerales sólo se detectaron entre los tipos de lesiones; siendo significativamente mayor en las lesiones inducidas por bacterias que en las inducidas químicamente. En contraste, las ganancias de dureza diferían entre los materiales. Las letras superíndice compartidas indican que no hay diferencias significativas entre los grupos. Línea y caja: mediana y percentiles 25/75, bigotes: Mín. / Máx. después de la exclusión de valores atípicos, círculos: valores atípicos.

Todos los valores brutos de microdureza se adjuntan en el ANEXO 5.

4.2.2 Fluorescencia y microscopía confocal.

La fluorescencia y la microscopía confocal confirmaron los resultados obtenidos durante la microrradiografía y las mediciones de microdureza. El proceso de desmineralización realizado con bacterias (D3) creó una dentina profundamente desmineralizada y desnaturalizada, similar a las lesiones residuales naturales (Fig. 46A). El protocolo de desmineralización D1 creó sólo lesiones superficiales, que mostraron una absorción limitada de fluoresceína. La absorción de fluoresceína en la dentina desmineralizada creada en el grupo D2 fue más profunda, aunque que no se detectó desnaturalización (Fig. 46B, 46C). Ninguno de los tratamientos remineralizó completamente las lesiones. Sin embargo, las lesiones D3 mostraron precipitación mineral detectable después de la remineralización utilizando BIO y MTA (Fig. 46D).

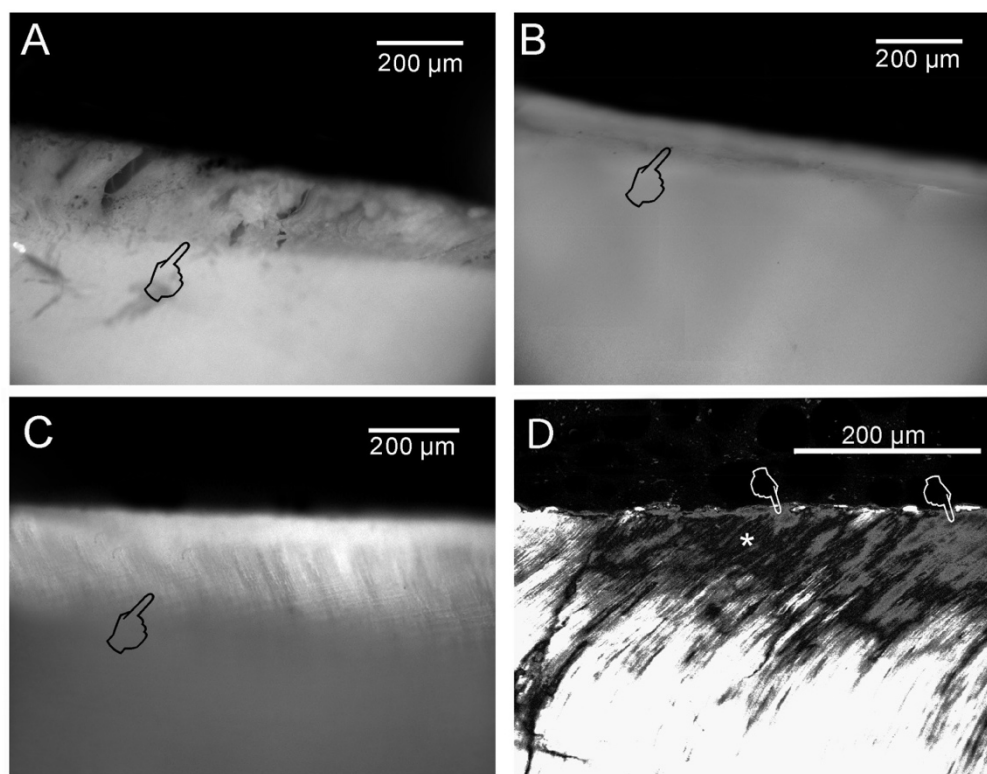


Fig. 46. Fluorescencia e imágenes de microscopía confocal en muestras de DAC “artificial” remineralizadas (ANEXO 1).

A) La microscopía de fluorescencia mostró que el proceso de desmineralización realizado en dentina con bacterias (D3) fue capaz de crear una capa de dentina profundamente desmineralizada y desnaturalizada (puntero).

B) El proceso de desmineralización química D1 fue capaz de desmineralizar la dentina sin crear desnaturalización. Sin embargo, esta capa desmineralizada era tan profunda (puntero) como la observada en las muestras químicamente desmineralizadas, utilizando el proceso D2.

C) En esta imagen confocal es posible ver que el área de desmineralización (indicador: captación de fluoresceína del colágeno de dentina desmineralizado) es más profunda de 200 μm .

D) Los únicos materiales que mostraron precipitación mineral evidente en dentina desmineralizada (punteros) durante la evaluación de microscopía confocal fueron MTA (que se muestra aquí en una lesión D3) y BIO. Sin embargo, grandes áreas de la dentina permanecen desmineralizadas.

4.2.3 Microscopía electrónica de transmisión (MET).

Dichos resultados fueron también confirmados por el análisis mediante MET, donde fue posible apreciar la precipitación mineral clara en la parte superior de la dentina tratada con BIO (Fig.47A) y MTA (Fig.47B). En estos últimos especímenes, a menudo se detectaron cristales minerales de forma irregular (con formas parecidas a agujas o globulares). En el caso de la DAC tratada con CIVMR, no hubo evidencia de remineralización del colágeno (Fig.47C). Las muestras restauradas usando EXP mostraron una precipitación mineral limitada en la parte superior de la dentina, y la remineralización de colágeno intrafibrilar "de dentro-afuera" fue localizada en los tres grupos, aunque sólo en algunas zonas, con una morfología del colágeno similar a la de la DS (Fig.47D).

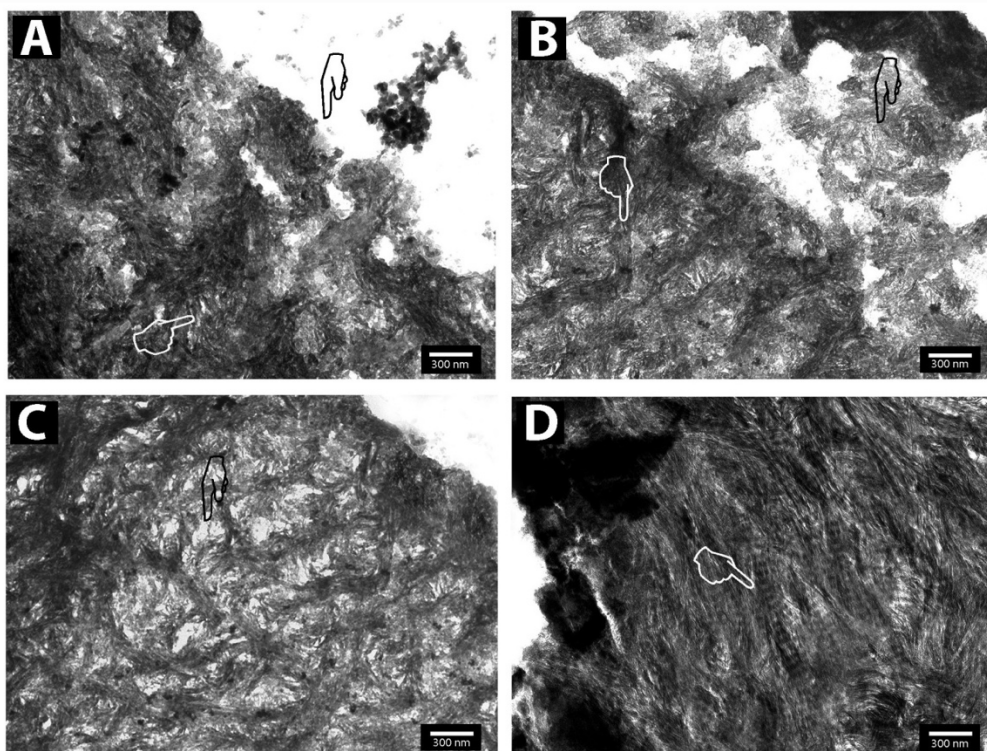


Fig. 47. Evaluación MET de lesiones remineralizadas (ANEXO 1).

A) Imagen MET representativa de una dentina mineralizada usando BIO. Se detecta una precipitación mineral clara en la parte superior de la dentina (puntero negro), y minerales con diferentes formas (aguja o globular) y dimensión (puntero blanco), están presentes dentro de la dentina desmineralizada.

B) La misma situación se observó con la dentina mineralizada usando MTA. Se puede detectar precipitación mineral evidente en la parte superior de la dentina (puntero negro), y se pueden apreciar minerales con diferentes formas y dimensiones (puntero blanco) dentro de la dentina desmineralizada.

C) Muestra de dentina tratada con CIVRM. En este caso no hubo evidencia de remineralización de colágeno (puntero negro).

D) La dentina tratada con EXP mostró en varios casos remineralización intrafibrilar (puntero blanco) en los tres tipos de lesiones, con una morfología del colágeno similar a la de la DS.

5. Discusión.

5. DISCUSIÓN.

5.1 Material y método DAC “natural”.

5.1.1 Método de obtención de la DAC.

Este punto, *a priori*, no pensábamos discutirlo, pero conforme avanzó el proyecto de investigación nos dimos cuenta de que a pesar del amplio soporte científico que tiene el sistema Carisolv®, como método fiable para la obtención de la DAC “natural”(88,98), empezamos a entender que era muy complejo que pudiéramos quedarnos siempre con una DAC “natural ideal”. De hecho, tras realizar una gran cantidad de pruebas de microdureza sobre DAC “artificial” que se presupone más homogénea, y no obtener los resultados esperados (ANEXO 5), decidimos realizar un análisis estadístico preliminar de microdureza sobre nuestras muestras de DAC “natural”, para valorar si tenía sentido o no hacerlo en todas. La hipótesis que barajábamos era que la DAC exhibía aparentemente más dureza de la que, hipotéticamente, debería tener 14-31 VHN (98). El resultado ya expuesto fue que al final trabajamos con una dentina relativamente bien mineralizada tras la excavación manual, ya que obtuvimos siempre valores por encima de 33 VHN.

Este hallazgo puede explicarse por la variabilidad a la hora de la excavación selectiva y la obtención de DAC, tal y como concluyeron Benarjee y cols. en el 2000 (99). En la actualidad, sigue siendo un problema la aparente falta de naturaleza “autolimitada” de los métodos de remoción de caries. Todas las técnicas disponibles eliminarán la dentina cariada con diferentes niveles de eficiencia (100), pero lo que es más importante, aún se desconoce si estas técnicas discriminarán entre la zona blanda, externa, necrótica, altamente infectada que necesita ser excavada y la interna, dañada reversiblemente, menos infectada y que podría ser conservada. Si no se produce esta discriminación real, esto podría conducir a una preparación excesiva de las cavidades con poco control sobre la calidad y la cantidad de tejido extraído en muchas muestras. Por lo tanto, sigue existiendo una importante

necesidad de evaluar los efectos de estas técnicas por su eficiencia y el alcance en la eliminación de la dentina cariada (101,102).

5.1.2 Procesamiento de especímenes para la obtención de barras para μ TBM.

Mención especial en este apartado merece el grupo de CIVMR, donde aproximadamente la mitad de los especímenes no superaron el paso por la máquina de corte, ya que el comportamiento mecánico del CIVMR es muy malo y ante la mínima vibración del disco de diamante se rompía y se separaba del sustrato con facilidad. Este resultado de fallo previo a la prueba también fue relevante en un estudio de Saad y cols en 2017 (103) sobre DS y DAC “artificial”, de hecho lo mencionan específicamente de cara a plantear el análisis estadístico como hemos hecho nosotros.

Sano y cols. concluyeron recientemente en una revisión(86), que el fallo de la prueba previo todavía supone un problema significativo cuando se usan adhesivos o materiales con baja resistencia de unión. Este hecho supuso evidentemente un problema “intrínseco” a la técnica que nos afectó claramente en la obtención de los especímenes para este grupo, ya que incluso muchas de las muestras que superaban el corte, al haber estado sometidas a la vibración, se separaban o se rompían antes de ser montadas en las portas para la prueba final de microtracción. Tenemos que destacar que repetimos el grupo hasta tres veces y siempre nos encontramos con la misma situación. En las siguientes imágenes se evidencia como quedaban algunos de los especímenes al fracturarse el material y separarse por completo de la DAC en la máquina de corte.

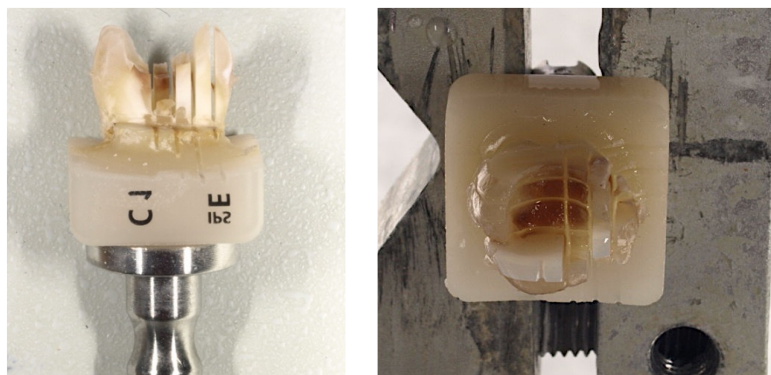


Fig. 48: en estas imágenes observamos la pérdida de la restauración en la máquina de corte antes de poder obtener los especímenes del grupo CIVMR.

5.1.3 Ensayo de μ TBM.

5.1.3.1 *Justificación de la prueba.*

Las pruebas de resistencia adhesiva, tanto "micro" como "macro", fueron, son y continuarán siendo herramientas importantes para mejorar la adhesión resina-diente y aumentar la vida útil de las restauraciones de resina (104). Los ensayos de microtracción evitan la formación de tensión interna y sus resultados se correlacionan mejor con la tasa de retención de las restauraciones, especialmente las cervicales, conocidas como clases V (105).

Una revisión de la literatura de Pashley y cols. en 1995 (106), resumió las ventajas del ensayo de μ TBM: se obtienen varias muestras de un solo diente, se observan más fallas adhesivas y menos cohesivas, presenta una alta resistencia de la interfase adhesiva al reducir los defectos de superficie, el análisis estadístico se puede calcular por dientes individuales, y finalmente permite un análisis de superficies irregulares en áreas muy pequeñas (1mm^2); siendo necesario *a posteriori* el uso de exámenes MEB y MET sobre la fractura para corroborar los resultados. Por otro lado, los inconvenientes se pueden resumir en la dificultad a la hora de la elaboración de la muestra, ya que la demanda técnica es elevada, junto al potencial de deshidratación de las muestras.

El último aspecto destacable del uso de una muestra más pequeña para evaluar la resistencia adhesiva en el laboratorio, se resume en que no elimina las alteraciones que el diente presenta, como por ejemplo: la heterogeneidad estructural, la anisotropía mecánica, la viscoelasticidad y la presencia de fluidos dentinarios (104).

5.1.3.2 Mecánica de los ensayos de μ TBM-problemática.

La prueba de resistencia adhesiva microtensil, se calcula teniendo en cuenta la aplicación de una carga tensil en la falla, dividida por el área transversal de la interfase de unión (107). Recordemos que esta resistencia es válida sólo si el esfuerzo es axial y uniforme, y si sobre él se aplica un máximo esfuerzo tensional distribuido homogéneamente sobre una mínima área de adhesión transversal. Por lo tanto, si existen condiciones experimentales constantes, se espera que la μ TBS resultante de un material de restauración (A) adherido a un sustrato (B), en diferentes laboratorios, puedan ser similares; sin embargo, la realidad es muy diferente, debido a que los métodos, maquinaria y parámetros utilizados por los diferentes laboratorios varían (108). Esto genera que la comparación de los resultados inter-laboratorio sea muy compleja (104), aunque se siga la norma general ISO/DTS 11405:2003 (E).

A estas variables, hay que sumarle el hecho de que incluso si una carga de tensión perfectamente uniforme es aplicada a través de una unión entre dentina-resina, puede ocurrir una distribución de esfuerzos no uniforme en la unión adhesiva. El coeficiente de Poisson³ (ν), sobre el módulo de Young⁴ (E), tendría que ser equivalente para: la resina compuesta, la interfase resina-adhesivo, la interfase CH-adhesivo resinoso, interfase CH-dentina, y la dentina, para entonces producir un esfuerzo de tensión uniforme (4), lo cual en la práctica resulta de extrema complejidad por no decir imposible.

A pesar de este inconveniente inherente a la técnica, sumado a la complejidad de

los materiales y sustratos, la prueba de μ TBM sigue siendo una de las técnicas más versátiles y utilizadas por los investigadores y la industria para testar la fuerza de adhesión de diferentes materiales. De ahí que Armstrong y cols. publicaran en 2017 (109) una guía en la Academia de Materiales Dentales sobre las pruebas *in vitro* que miden la efectividad de la unión de los adhesivos dentales a la dentina / esmalte, concluyendo que el test de μ TBM es la mejor prueba para medir la retención de la restauración de composite, si bien reconocen las limitaciones de un método de prueba estático y basado en la fuerza.

5.2 Material y método DAC “artificial”.

En la segunda parte del proyecto de tesis, decidimos testar sistemas remineralizantes comerciales frente al EXP-SE estandarizando la muestra de DAC, las razones que nos condujeron a elaborar este tipo de muestra ya han sido justificadas, pero las podríamos resumirlas fundamentalmente en tres:

1. La estandarización de la DAC “natural” es imposible y encontrar muestras de calidad para el ensayo es francamente difícil porque los dientes extraídos están muy deteriorados, lo podemos concluir porque tuvimos acceso a una gran cantidad de dientes extraídos, donde aproximadamente el 90% tenían que ser desechados en primera instancia porque no reunían las condiciones mínimas suficientes para incluirlos en el estudio.
2. La DAC “genuina o natural” es más compleja de remineralizar por las diferentes profundidades de la lesión y grado de oclusión tubular (110).
3. En las lesiones artificiales podemos tener un gradiente continuo de desmineralización desde la superficie de la lesión hasta la base. En cambio, la desmineralización en la DAC “natural”, a menudo, se manifiesta en forma de islas esporádicas de desmineralización (111); lo cual hace más difícil interpretar los resultados, porque puede haber zonas adyacentes de dentina terciaria/esclerótica

que no sean susceptibles de remineralización y al final arrojen datos confusos. De ahí la desestimación de seguir realizando pruebas de microdureza a T1 en la otra parte del proyecto de tesis.

No obstante, a pesar de tener un sustrato homogéneo de base, ya hemos comentado en el apartado de resultados que no pudimos obtener una remineralización completa o total de las lesiones con ningún material. Sí se detectaron diferentes aumentos en el contenido mineral entre los tres tipos de lesiones simuladas (D1, D2 y D3). De hecho, se observaron mayores ganancias minerales relativas en lesiones profundas inducidas por bacterias (D3) en comparación con las superficiales (D1) o profundas inducidas químicamente (D2).

Este hecho nos empuja a tener que desarrollar en el futuro nuevos modelos de DAC “artificial”, lo más parecidos a la DAC “natural” y a la vez lo suficientemente homogéneos como para poder inducir una remineralización biomimética controlada. Sólo así podremos inferir e implementar protocolos clínicos adhesivos que puedan mejorar con garantías el sustrato de DAC real que nos encontramos en la clínica.

También tenemos que mencionar que sólo se han utilizado materiales comerciales representativos y un experimental, y existe una amplia gama de silicatos de calcio disponibles que podrían haberse probado (112). Por último, sólo evaluamos en esta parte las ganancias de minerales, microdureza, y estudiamos más a fondo los efectos ultraestructurales. Aquí no se han probado los efectos sobre la pulpa directamente, o sobre las bacterias dentro de las lesiones cariosas contaminadas (93).

5.3 Resultados DAC “natural”.

5.3.1 Microtensión (μ TBS).

La conclusión principal de los resultados es que se produjo una reducción significativa de la resistencia adhesiva al año de seguimiento en todos los grupos

($p < 0,001$). Este resultado está en consonancia con los obtenidos por Erhardt y cols en 2008 (113), en los cuales concluyeron tras 6 meses de envejecimiento en agua, que las muestras de DAC con diferentes adhesivos, tanto en modo SE o ER, presentaban una disminución significativa de μ TBS con el tiempo, al MEB observaron un aumento en la zona de colágeno expuesto sumado a una disminución en la calidad de la infiltración adhesiva en las interfases.

La reducción que obtuvimos nosotros es bastante similar entre todos los grupos ($p = 0,661$), salvo en el grupo EXP-SE, que se destaca por un patrón más mantenido a lo largo del tiempo (114). EXP-ER también resulta ser más estable que AU, OPT y CIVMR, aunque menos que EXP-SE. Este resultado concuerda con los obtenidos por Par y cols. en 2018 (114) donde utilizaron un composite a base de BAG 45S5 en diferentes concentraciones sobre DS, realizaron μ TBS a muy baja velocidad (0.5mm/min hasta la fractura), a 1 semana, 1 mes, 3 meses, 6 meses y 12 meses, concluyendo que al año de envejecimiento en agua no obtuvieron ningún deterioro de la resistencia de unión de los materiales experimentales aunque sí de la confiabilidad de la unión (el análisis de confiabilidad lo realizaron utilizando las estadísticas de Weibull).

Hay que volver a comentar que existen diferencias claras en la profundidad de la desmineralización de la dentina y el grado de infiltración adhesiva en DAC "natural" (115). Debido a la alteración estructural y las porosidades que la caracterizan, se generan capas desmineralizadas más profundas. Cuanto más profundo es el colágeno desmineralizado, más pobre es la infiltración de resina, esto da como resultado una separación de fases de los adhesivos y una resistencia de unión "débil" (115). En este sentido, tenemos que destacar el elevado número de fracturas mixtas/cohesivas en la propia dentina tanto a T0 como a T1 en AU y OPT, esto nos llevó a considerar que en muchas ocasiones teníamos DAC mezclada con DI como sustrato.

No obstante, debemos tener en cuenta, que la dentina acondicionada con ácido ortofosfórico experimenta mayor nivel de degradación vía hidrólisis, si la comparamos con técnicas de autograbado, el abordaje ER elimina todo el barrillo dentinario, incrementando la permeabilidad y profundidad de la desmineralización (116). Aproximadamente el 50% en volumen de dentina previamente ocupada por minerales en DS, es reemplazada por agua tras el enjuague, y el sistema adhesivo ideal debería desplazar la mayor cantidad de agua posible de la dentina desmineralizada para crear una hipotética encapsulación perfecta de todas las fibrillas de colágeno con la intención de obtener enlaces óptimos y duraderos, pero esto en la práctica no ocurre ya que es prácticamente imposible reemplazar por completo el agua residual (117).

En este sentido, atendiendo al comportamiento de los adhesivos SE y ER, así como al análisis fractográfico del sustrato, tenemos que destacar el estudio ya clásico llevado a cabo por Yoshiyama y cols. en 2002 (32) donde realizaron procedimientos adhesivos en DS, DAC y DI. Respecto a la DAC ya hemos descrito que está parcialmente desmineralizada (118). Por su parte, la dentina intertubular cariada exhibía un mayor grado de porosidad que la dentina intertubular sana, debido a la pérdida de mineral. Sus resultados ultraestructurales coincidieron con estudios previos descritos en la introducción de esta tesis, las capas híbridas en la DAC eran más gruesas que las de la DS (35), lo que sugiere una difusión más fácil de acondicionadores ácidos y monómeros adhesivos, debido a una mayor porosidad en la dentina intertubular. No obstante, la infiltración de resina en los túbulos dentinarios se vio gravemente obstaculizada por la presencia de minerales resistentes a los ácidos dentro de los túbulos dentinarios de la DAC y DI. Esto puede reducir la retención de resina, particularmente cuando se usan los primers autograbantes de pH débil. En experimentos paralelos, midieron la dureza Knoop y la resistencia a la microtracción final de la DS y DAC. La DAC era más blanda y débil que la DS. Muchas muestras de DAC unida a resina fallaron cohesivamente en la dentina, presumiblemente porque era más débil que la resina de unión. Esto no ocurrió en la DS, donde las fracturas eran principalmente adhesivas.

Para estos autores, la menor resistencia a la tracción de los adhesivos probados en DAC y DI en comparación con DS probablemente se deba a varios factores:

1. La falta de formación de tags de resina debido a la presencia de depósitos minerales intratubulares resistentes a los ácidos; esto disminuye el módulo de elasticidad y la resistencia cohesiva de dicha dentina.

2. Especularon que la dureza Knoop inmensurable de la DI se debía a la pérdida casi completa de la fase mineral de la dentina y a la desnaturalización de su matriz colágena. Los bajos valores de dureza de Knoop en la DI pueden reflejar un menor número de cristales de apatita, que son más grandes y ya no encajan adecuadamente en los espacios inter e intrafibrilares en una matriz de colágeno normal. En la medida en que exista algún enlace químico entre los derivados de metacrilatos carboxílicos o fosfato de la fase mineral, entonces menos cristales ofrecerían menos área de superficie para la interacción. Por último, mencionar que las uniones de hidrógeno entre las resinas y el colágeno pueden contribuir a la fuerza de unión en la DS y quizás en la DAC si presenta un colágeno suficientemente estructurado, pero no podría ocurrir con la matriz desnaturalizada de la DI.

Volviendo a nuestro estudio, el resultado de reducción generalizada de la resistencia adhesiva pero menor en EXP-SE a T1, responde de manera positiva al primer objetivo de este proyecto de tesis, donde nos preguntamos acerca de la estabilidad adhesiva del material experimental. Se trata de un resultado “esperado” ya que teóricamente el sustrato de DAC se ha podido remineralizar por la liberación de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} , lo cual conduce a la estabilidad de la CH. En esta misma línea, Tekçe y cols. (119) demostraron que el uso de compuestos fluidos a base de resina, CIVMR y compómeros, pueden proporcionar una mayor fuerza de unión a la dentina y un mejor sellado de márgenes que los materiales convencionales de CIV, debido a la capacidad de dichos materiales para disipar el estrés oclusal y el efecto

terapéutico de los iones liberados a lo largo del tiempo. Esta conclusión explica por qué al año prácticamente no tenemos fracturas de tipo adhesivo en el grupo CIVMR, siendo prácticamente todas cohesivas. En el caso de EXP-ER sucede algo parecido, bajan mucho las adhesivas en favor de las mixtas-cohesivas, lo cual puede ser indicativo de remineralización.

Por otro lado, el hecho de no grabar con ácido fosfórico también afectó positivamente, y explica las diferencias entre EXP-SE y EXP-ER, ya que la está claro que la infiltración adhesiva se iguala más a la desmineralización colágena. Esto hizo que tuviéramos una CH más estable y todos los “detritus” y agua residual reaccionaran con las partículas de BAG-F, que son las responsables de neutralizarlos e inducir remineralización biomimética a través de la precipitación de cristales de apatita, a la vez que se fosilizan las MMPs (14).

Otros estudios previos también han puesto de manifiesto que la resistencia de unión microtensil se conservó en los grupos experimentales, a base de materiales liberadores de iones, después de 3 y 6 meses de almacenamiento en las muestras de DS con sistemas adhesivos aplicados en modo ER y SE, respectivamente (39,42).

5.3.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB).

Puso de manifiesto el deterioro de la interfaz al año de almacenamiento en el caso de AU y OPT, no se apreciaban fibras colágenas ya que muy probablemente se habrían degradado por la acción hidrolítica de colagenasas, MMPs y cisteína-catepsinas (17,120). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por El Gezawi y cols. (121), donde ninguno de los adhesivos testados, en modo SE y ER, eliminaron por completo la microfibración en DS a T0. El envejecimiento durante 6 meses en agua afectó de manera distinta a los grupos, el grupo SE mostró una absorción de partículas de plata significativamente menor que los otros dos grupos ($p < 0.05$). Las partículas de plata se acumularon en la CH, túbulos dentinarios

infiltrados y en la propia capa adhesiva. Gracias también a la revisión sistemática de Frassetto y cols. en 2016 (19) sobre los mecanismos de degradación de la CH, podemos concluir que cualquier tipo de degradación sucede con mayor intensidad y rapidez cuando se trata del sustrato DAC en comparación con DS.

Por el contrario, en el caso de CIVMR siempre vemos material cubriendo la DAC, tanto a T0 como a T1. Este hallazgo concuerda con los resultados obtenidos en DS por Sauro y cols. en 2019 (122), donde todas las muestras creadas con CIVMR mostraron un modo de fallo principalmente cohesivo, dejando una clara presencia de material aún adherido a la dentina. Cuando se trata de DAC, volvemos a destacar los resultados de Saad y cols. (103) que están en consonancia con los nuestros, ya que a los tres meses de envejecimiento confirman al MEB que no encuentran fallos adhesivos, siempre son mixtos y cohesivos en el material, confirmando la presencia de una delgada capa de CIVMR en los especímenes.

Contrastada la literatura, deducimos como mínimo, protección colágena y la más que probable remineralización, por su ya mencionado efecto liberador de iones (57,123). Ahora bien, esta remineralización propuesta por los CIVMR no es biomimética, porque no se produce a nivel intrafibrilar, y no redundaría en una *“restitutio ad integrum”* de las propiedades biomecánicas de la dentina (50,91). Este proceso es mucho más complejo, requiere evidentemente de sustancias biocompatibles que interaccionen con la dentina humana, pero también de la participación de análogos biomiméticos o polianiones, como APA o TMP, para que el proceso ocurra a nivel inter e intrafibrilar, de “dentro-afuera” (9,39,124).

El material EXP contiene APA-TMP + VB ($\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$) (125), dopado con fluoruro (BAG-F), y las imágenes que obtuvimos a T0 y T1 concuerdan con los resultados de Efflandt y cols. en 2002 (126), donde los análisis al MEB mostraron un material ultraestructuralmente diferente en la interfaz fracturada. Sus análisis químicos revelaron además que los iones procedentes del vidrio penetraron en la

dentina y que la superficie de ésta en contacto con bioglass® fue modificada. La microdifracción⁶ mostró la presencia de apatita en la interfaz.

5.3.3 Micor análisis MEB-EDX.

El hallazgo más relevante es que los valores de concentración de P tienden a bajar en todos los grupos excepto en los 2 grupos EXP. Sin diferencias significativas, la batería de pruebas resuelve un fuerte aumento de la concentración de P en el grupo EXP-SE y fuerte disminución en CIVMR y AU-SE.

Es bien conocido que los materiales bioactivos como nuestro material EXP, que contiene VB a base de resina puede liberar Ca^{2+} y PO_4^{3-} que reprecipitan como cristales de tipo apatita (65). Sin embargo, también es importante tener en cuenta que la presencia de VB dentro de las interfases resina-dentina puede inducir la liberación de $\text{Si}(\text{OH})_4$, que luego se une inespecíficamente a las fibrillas de colágeno desmineralizadas y se polimeriza en una capa porosa rica en SiO_2 . Dicha capa podría servir como plantilla para la precipitación de PCA (42,127) que posteriormente se convierte en apatita biomimética no estequiométrica⁵ en un ambiente alcalino (128). Este último ambiente se logra mediante un intercambio rápido de iones Na^+ , H^+ o ion de hidronio (H_3O^+), junto con la condensación de $\text{Si}(\text{OH})_4$ y la precipitación de Ca^{2+} y PO_4^{3-} (129), que contribuyen a fosilizar enzimas proteolíticas, reduciendo así su capacidad de degradación (11).

Volviendo al estudio de Tezvergil-Mutluay y cols. en 2017 (89), La resina BAG-F mostró una mayor capacidad que BAG sola, de cara a aumentar la rigidez de las muestras de dentina desmineralizadas. Estos resultados también fueron respaldados por la espectroscopia de transmisión de infrarrojo transformada de Fourier (FTIR) y MEB.

Ya hemos mencionado que los VB que contienen flúor son bien conocidos por liberar iones de flúor en solución (130). Además, el VB con flúor que se utilizó en el

estudio comentado, así como en el nuestro, tiene un mayor contenido de PO_4^{3-} en comparación con bioglass 45S5. Se sabe que ambos elementos aceleran la formación de apatita manteniendo la misma conectividad de red (es decir, la misma polimerización de la red de silicato) de bioglass 45S5 (131), pero suponemos que la liberación de iones fluorados y la mayor bioactividad de un bioglass tan innovador incorporado en la resina (BAG-F) pudo haber contribuido a lograr mejores resultados.

Por otra parte, se ha defendido que el flúor podría inhibir la MMP-2 y MMP-9 de saliva humana, Kato y cols. en 2014 (132) y Brackett y cols. en 2015 (133) mostraron que 150 ppm de NaF podrían inhibir tanto MMP-2 soluble como unida a matriz, MMP-8 y MMP-9. Además, estos autores plantearon la hipótesis de que 75 a 600 ppm de fluoruro podrían formar complejos no solo con calcio ionizado unido a la enzima sino también con iones Ca^{2+} en el medio de incubación para formar CaF_2 fuertemente complejado. Por lo tanto, el flúor puede quelar Ca^{2+} y Zn^{2+} para inactivar las MMPs; que a su vez dependen del calcio para mantener su configuración tridimensional y poder desarrollar la actividad enzimática. Por otra parte, el flúor también ha demostrado ser efectivo inhibiendo la cathepsina K y B recombinante humana (134) aunque el mecanismo de inhibición no está claro y requiere de más investigaciones.

Volviendo a nuestro estudio de microanálisis, el resultado del aumento de la concentración de calcio y su ratio que experimentó el grupo AU-SE con el envejecimiento, se puede explicar por la degradación del adhesivo y a la continua absorción de Ca^{2+} por el monómero funcional (135). Cuando se va degradando el adhesivo, se producen ácidos orgánicos y se liberan grupos fosfórico del monómero funcional que capturan calcio en la saliva artificial o STP (136).

En el caso de EXP-SE a T1 baja la ratio Ca/P, ya que el P se eleva cerca de la significatividad estadística, mientras el Ca se mantiene estable. En el caso de EXP-ER, la ratio es más estable en el tiempo ya que el P sube menos. Este resultado

confirma también, de manera positiva, el segundo objetivo específico de la tesis, que era valorar la capacidad remineralizante del material EXP en DAC “natural”. Además, si los contrastamos con la literatura, Tariq y cols. en 2016 (97), ya concluyeron que una ratio Ca/P de 1.7 era compatible con la neoformación de HA. Aunque Zhou y cols en 2020 (137) han demostrado remineralización de DAC “artificial” con una ratio Ca/P de 1.61 en muestras que contenían tripolifosfato de sodio junto a un fosfopéptido de caseína y fosfato de calcio amorfo (TPP + PC-PCA).

Estos resultados concuerdan también con los de Sauro y cols. en 2015 (39), que realizaron un estudio de seguimiento, uniendo análogos biomiméticos de fosfoproteínas (TMP + APA) directamente al colágeno, en lugar de tenerlo en solución. El estudio mostró una remineralización completa del colágeno dentinal, a través del mecanismo la remineralización biomimética “de dentro-afuera”, así como una mayor reducción en la micropermeabilidad, debido a la precipitación mineral después de 3 meses.

En estudios previos (40,138) se utilizó un enfoque similar al de Sauro y cols. (39), pero basado en un cemento portland de silicato cálcico libre de fosfato, y un sistema que contenía fluidos y fosfato en presencia de APA, como estabilizador para PCA, y ácido polivinilfosfónico (APVP), como una proteína de matriz de unión al colágeno, y así poder evocar la bio-remineralización extrafibrilar e intrafibrilar del colágeno dentinario dentro de la CH.

Por otro lado, este tipo de cementos tipo portland, comúnmente conocidos como MTA, han encontrado importantes aplicaciones en odontología debido a sus propiedades de remineralización bioactiva (71), aunque no biomimética, ya que se produce “de fuera-adentro”; causando en la mayoría de las ocasiones una degradación cáustica del colágeno a través de una gran precipitación mineral. Por ejemplo, los cementos de tipo MTA se pueden usar en tratamientos restauradores atraumáticos como materiales indirectos de recubrimiento pulpar tras una preparación mínima de cavidades en lesiones cariosas profundas. Sin embargo,

este enfoque requiere la presencia de fluidos corporales que contengan fosfato para evocar una remineralización adecuada de la dentina empobrecida en minerales (69). Se ha descrito y ya hemos mencionado que es posible obtener una remineralización biomimética de lesiones similares a caries cuando se usan cementos portland en presencia de un fluido corporal simulado que contiene APA, APVP y TMP (139). Si bien, esta técnica logra una remineralización efectiva in vitro, no se puede adoptar clínicamente para remineralizar la DAC y / o las interfases con depleción de minerales, ya que los análogos biomiméticos no se pueden disolver en fluidos corporales.

Volviendo a enfatizar en los resultados de Sauro y cols. (39), destacamos su enfoque alternativo basado en el pretratamiento de la dentina desmineralizada con primers biomiméticos acuosos (APA y / o TMP), lo cual constituye una estrategia válida y testada de remineralización biomimética o “de dentro-afuera”.

Otros autores como García y cols. (140), intentaron inducir la deposición de minerales en la interfaz y en la DAC “natural” utilizando adhesivos dopados con alfa-tricalciofostato (α -TCP), HA y octacalciofosfato (OCP); utilizaron el análisis Raman para demostrar que el grupo con α -TCP tenía los mejores resultados, probablemente por el tamaño de partícula y diferencias en la solubilidad respecto a las otras dos sustancias competidoras. No obstante, ellos enfatizaron que su estudio sólo evaluó el potencial de diferentes adhesivos dopados para inducir la reprecipitación de ortofosfatos de calcio en la DAC, lo cual no puede considerarse una verdadera remineralización. Sin embargo, proporcionaron información sobre el comportamiento de las diferentes propuestas de rellenos para los futuros adhesivos. Concluyeron que el grupo que contenía α -TCP podía establecer una mejor unión a la DAC que un adhesivo sin rellenos adicionales, y podía también mejorar la deposición mineral en este tejido después de la eliminación selectiva de dentina cariada. El adhesivo con α -TCP presentó el mejor rendimiento, posiblemente representando una prometedora resina adhesiva para la remineralización biomimética.

Por otra parte, investigaciones publicadas por Spencer y cols en 2019 (2), basadas en ingeniería genética de péptidos, han demostrado también a través de imágenes espectroscópicas Raman, la remineralización de la interfaz dentina/resina, añadiendo a los adhesivos péptidos específicos para formar HA. Además, desarrollaron formulaciones adhesivas con péptidos antibacterianos, que *a priori* contribuirían a reducir la posibilidad de aparición de caries secundaria. Estos adhesivos “inteligentes” constituirían también una alternativa que proporcionaría diversas biofunciones a la interfaz entre el adhesivo y la dentina.

No obstante, la formación o el aumento de concentración de minerales por sí solo es insuficiente para determinar la funcionalidad real de la dentina durante la remineralización biomimética (141,142). El paradigma ideal de la remineralización debería ser restaurar completamente las propiedades mecánicas de la dentina desmineralizada (143). Aunque la *“restitutio ad integrum”* puede resultar muy ambiciosa, algunos investigadores, además de demostrar remineralización, también han conseguido restituir las propiedades biomecánicas. Gu y cols. en 2010 (144) , ya utilizaron un modelo macro de dentina desmineralizada infiltrada en resina (300 µm) para evaluar las distribuciones del módulo de flexión y la densidad mineral después de la remineralización biomimética . Sus resultados son dignos de mención: *“los módulos elásticos de la dentina control, infiltrada en resina, permanecieron consistentemente bajos, mientras que los sumergidos en el medio de remineralización biomimética, aumentaron en un 55-118% más después de 4 meses”*. La remineralización inter e intrafibrilar de la dentina intertubular no infiltrada con resina, se puso de manifiesto bajo MET, junto con la dentina peritubular también remineralizada.

Por su parte Ryou y cols. en 2011 (138), emplearon un análisis mecánico nanodinámico para determinar el efecto de la remineralización biomimética en las propiedades nanomecánicas de la CH, y concluyeron que, el comportamiento mecánico se recuperó al nivel del de la base de dentina mineralizada. Sin embargo,

la CH mostró una disminución significativa del comportamiento mecánico sin la aplicación de análogos biomiméticos.

5.3.4 Microdureza.

Según nuestras observaciones de la DAC “natural” obtenida por excavación y análisis preliminar, obtuvimos una dentina que en muchas ocasiones era más dura de lo normal a T0, por encima de 33 VHN. En una revisión reciente de Sano y cols. en 2020 (86), se determinó la dureza media de la DAC en 15 VHN, y se hace hincapié en la dificultad clínica a la hora de preservar esta capa, que suele ser de unas 50µm. Además, se suman los resultados de la otra parte del proyecto de tesis sobre DAC “artificial”, donde no obtuvimos correlación directa entre los valores de microdureza y el grado de remineralización de la DAC con EXP-SE. En esta parte, en lo que respecta a la obtención de la DAC, hay que resaltar que eliminamos el factor operador al no haber excavación manual (50).

Este análisis nos llevó a desistir de realizar más test de microdureza en las muestras de DAC “natural” a T1, asumiendo que tras la excavación no sólo teníamos DAC, sino también dentina terciaria-esclerótica más dura que la DAC genuina y con mucho componente mineral reactivo de base, lo cual nos confundiría o falsearía los resultados a la hora de establecer la posible remineralización biomimética de las áreas de DAC realmente susceptibles de ser remineralizadas. En este contexto, la remineralización biomimética de una DAC “poco susceptible” no tiene sentido, ya que, como mencionamos en la introducción, necesita de unas condiciones muy particulares de organización de la red colágena muy complejas de reproducir “in vitro” para que la remineralización biomimética ocurra realmente “de dentro-afuera”.

Además, tenemos que destacar que la bibliografía disponible actualmente, deja la puerta abierta a que es muy complejo dejar una cantidad de dentina realmente afectada medible con un microdurómetro, y a la vez, lo suficientemente organizada para la remineralización. Este argumento refrendado por la otra parte del proyecto

de tesis, donde sí realizamos todos los ensayos de microdureza a todas las muestras (ANEXO 5), nos confirmó que esta prueba quizás no iba a ser la más adecuada y concluyente a la hora de demostrar una posible recuperación de las propiedades biomecánicas de la DAC “natural” en el tiempo (99,101,145,146).

5.3.5 Microscopía confocal.

La microscopía confocal soporta los hallazgos de MEB igualmente, en el caso de AU-SE y OPT, vemos a T0 capas híbridas homogéneas y estables con buena infiltración tubular, estos resultados concuerdan con los de Sezinando y cols. en 2014 (147), donde concluye que Optibond FL (Kerr) puede considerarse el “estándar de oro” de su clase, ya que resultó con mayores fuerzas de unión microtensil, menor microfiltración y mayor grado de conversión en comparación con Scotchbond Multipurpose (3M ESPE), All -Bond 3 (Bisco Inc.) y Fusion Duralink (Angelus).

Al año, observamos otros resultados cuando evaluamos AU-SE y OPT, comenzamos a apreciar una dentina muy porosa y permeable por la gran cantidad de señal fluorescente, al contrario ocurrió en el grupo CIVMR, donde la señal fue más débil, producto de la posible remineralización, porque tal y como hemos demostrado, el colágeno queda protegido, y por lo tanto la degradación tiene que ser menor, aunque no podemos establecer con certeza el grado de remineralización (148).

Respecto al CIVMR , Tanumiharja y cols. en 2001(149) describieron la capa de "intercambio iónico" de "tipo híbrido" que forman los materiales a base de CIV, explicaron la formación de capas resistentes ácido-base consecuencia de la interacción química del material con los cristales de HA para formar sales de calcio menos solubles que son capaces de resistir los cambios mediados por reacciones ácido / base. Inoue y cols. en 2006 (150), afirmaron que la formación de zonas resistentes ácido-base debajo de la CH se considera un signo de refuerzo de DAC, y Nikaido y cols. en 2009 (151) se refirieron a esta dentina como una "súper dentina".

Hamama y cols. en 2015 (152) tras utilizar varios métodos de remoción de DI y obtención de DAC “natural”, entre los que se encontraba Carisolv[®], demostraron mediante MEB una gruesa zona ácido-base resistente (~200 μm) debajo de la interfaz dentina/CIVMR, en áreas de DAC. Concluyeron que los CIVMR pueden dotar de un refuerzo considerable a la DAC. Las capas ácido-base resistentes que se observaron pueden atribuirse a la estructura bifuncional de los CIVMR, que contienen un componente de resina que se infiltra en las zonas porosas de la DAC y un vidrio de aluminosilicato que se une químicamente a los cristales residuales de HA. Además, los CIVMR (Riva Bond LC y Fuji Bond LC) que fueron utilizados contienen el monómero hidrófilo, 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA), que puede mejorar la penetración del agente de unión en el poro húmedo.

Volviendo al análisis confocal propiamente dicho, en el caso del material EXP-ER, la señal fue muy parecida a CIVMR, no vemos CH porque quizás se degradó o mineralizó, aunque no lo podemos asegurar tampoco. En el caso de EXP-SE, sí que vemos la CH tras el envejecimiento, este hallazgo se correlaciona con el de μTBM , donde tras 1 año, el EXP-SE se distancia del EXP-ER y del CIVMR, por su gran proporción de fracturas adhesivas, quizás porque la CH es más fuerte y permanece o se ha remineralizado. Además, sabemos por la literatura que la CH puede ser más estable que en el grupo EXP-ER (153).

En el grupo EXP-SE la señal en DAC también fue débil (154), porque probablemente los iones procedentes del material estén reaccionando con todo el barrillo dentinario y el agua residual, desencadenando precipitación cristalina, reduciendo la microporosidad y por ende protegiendo el colágeno de la degradación mediada por MMPs (14,155).

Las proteasas endógenas como las MMPs y las catepsinas de cisteína (por ejemplo la catepsina K) en la matriz de dentina desmineralizada pueden escindir los segmentos helicoidales y telopéptidos de la matriz de colágeno, lo que resulta en

una disminución de las propiedades mecánicas de la dentina y la longevidad de las restauraciones (11). La razón para analizar los fragmentos de telopéptidos C-terminales específicos (por ejemplo, ICTP y CTX) es evaluar la degradación mediada por MMPs y catepsina K por separado (38).

Un estudio llevado a cabo por Tezvergil-Mutluay y cols. en 2017 (89) donde testaron materiales con el mismo bioglass dopado con fluoruro (BAG-F) que usamos nosotros, obtuvieron los siguientes resultados.

Las muestras de matriz dentinaria desmineralizada de los grupos BAG y BAG-F presentaron una liberación de CTX e ICTP significativamente menor en comparación con los controles. BAG-F indujo una mayor inhibición de ICTP a los 3 días e inhibición de MMPs a los 30 días de almacenamiento en saliva artificial en comparación con BAG ($P < 0.05$). Este resultado contrastaría con los hallazgos de estudios anteriores publicados, que mostraban una zona de degradación colágena en contacto con materiales alcalinos fuertes como los cementos de silicato de calcio (70). Por el contrario, se ha demostrado que los materiales a base de resina dopados con rellenos bioactivos como bioglass 45S5 conservan la integridad de las fibrillas de colágeno dentro de la CH incluso después de un almacenamiento prolongado en fluidos corporales simulados (154).

5.4 Resultados DAC “artificial”.

5.4.1 Mineralización (MRT) y microdureza.

En este apartado damos respuesta al tercer objetivo del proyecto del proyecto de tesis y concluimos que la capacidad remineralizante del material EXP no es superior a la del resto de sistemas comerciales, aunque sí de una manera muy diferente. La microdureza sólo se incrementó selectivamente por los materiales restauradores. Por ejemplo, CIVMR no pudo aumentar la dureza independientemente del tipo de lesión y EXP-SE proporcionó una ganancia de dureza significativa sólo en las muestras del grupo D3. BIO y MTA aumentaron la dureza en todos los tipos de

lesiones (D1, D2 Y D3) y los resultados fueron significativamente superiores a CIVMR y EXP ($p < 0.05$).

Concretamente, se descubrió que los materiales a base de silicato de calcio utilizados en este estudio formaban una capa de tejido remineralizado intermedio, estructuralmente alterado, entre el cemento y la dentina. Este resultado concuerda con los hallazgos reportados por Atmeh y cols. en 2012 (70) quien demostró además que BIO pudo desencadenar una infiltración mineral en dentina, justo debajo del cemento. Se sugirió que la formación de dicha capa es el resultado de la formación de carbonato y/o apatita dentro de los túbulos dentinarios superficiales (156). Sin embargo, nuestros resultados MET revelaron que dicha precipitación mineral lograda tanto con BIO como con MTA, se caracterizó por la ausencia de fibrillas de colágeno.

Es bien sabido que los cementos de silicato de calcio forman hidróxido de calcio, que es un material altamente alcalino ($pH = 13$), y por lo tanto pueden causar degradación cáustica del colágeno desmineralizado expuesto. Este efecto está mediado por la ruptura de los enlaces intermoleculares en las fibrillas de colágeno, lo que aumenta su absorción de agua y provoca hinchazón (157).

Podríamos concluir que los cementos de silicato de calcio pueden suministrar una gran cantidad de minerales a la dentina desmineralizada, aumentando así su dureza, pero sin posibilidad de lograr la remineralización intrafibrilar y la recuperación del módulo de elasticidad original de la DS (148).

En esta parte del proyecto, cuando evaluamos el aumento de microdureza, hay que volver a subrayar que después del período de remineralización, se observó que los cuatro materiales restauradores indujeron una ganancia mineral, pero sin ninguna diferencia significativa entre los grupos ($p > 0.05$). Sin embargo, se detectaron diferencias en la ganancia mineral entre los tipos de lesiones; Se observaron valores significativamente más altos en lesiones profundas inducidas por bacterias en

comparación con lesiones superficiales o profundas inducidas químicamente. De hecho, CIVMR proporcionó ganancia de minerales, pero no de dureza en la dentina desmineralizada. Por lo tanto, mientras que la DAC “artificial” puede ser “remineralizada” usando CIVMR (158), incluso a profundidades significativas (91), no se puede esperar la formación de apatita carbonatada dentro y alrededor de las fibrillas de colágeno en la dentina desmineralizada. Cabe destacar que el uso de EXP-SE, proporcionó igualmente ganancias de minerales y microdureza, aunque solo se produjo un aumento de la microdureza de manera significativa en el grupo D3.

Este último resultado concuerda con el que obtuvieron Tezvergil y cols. en 2017 (89). Recordemos que en su estudio se usó el mismo BAG-F que en el material EXP del nuestro, y fue capaz de alcalinizar los medios de incubación, reducir la solubilización de los telopéptidos de colágeno dentinario y aumentar significativamente la rigidez de las matrices de dentina desmineralizadas. Estos materiales podrían entonces ayudar a desencadenar al crecimiento epitaxial de los cristales de HA restantes en las regiones de dentina desmineralizada parcial. Particularmente podrían servir como núcleos en regiones de dentina desmineralizadas en exceso que carecen de los núcleos de cristal de HA. Por lo tanto, las zonas desmineralizadas en la región de la CH podrían remineralizarse también (155).

Aún así, existen autores como Chien y cols. en 2017 (159), que aún reconociendo la necesidad de polianiones (TMP, APA, ASPA, APVP), le otorgan un grado autolimitado en la biomineralización y resaltan el papel que juegan las proteínas solubles no colágenas (PNCs), que actúan en concierto con un andamio macromolecular insoluble para guiar la formación de minerales. En general, se cree que las proteínas de la matriz extracelular, juegan un papel importante en el control de la nucleación y el crecimiento de apatita en el proceso de remineralización de la dentina (160). La remineralización biomimética representa en este sentido un enfoque un poco diferente al intentar rellenar el colágeno de dentina

desmineralizado con partículas de nanoprecusores (PCA), que se estabilizan mediante peptoides sintéticos (161). De esta manera, esta nucleación particular proporcionaría una reestructuración regular y factible de la dentina desmineralizada y también proporcionaría un sustrato favorable para la unión (162).

En un estudio de Barbosa-Martins y cols. en 2018 (48), se utilizó un péptido sintético y mostró una mejora significativa en los resultados de μ TBS sobre varios modelos de DAC “artificial”. Se sugiere que el uso de péptidos es capaz de nuclear HA y promover la reparación de lesiones similares a caries “in vitro” (48). De hecho, existen otros grupos de investigación que utilizan otros péptidos y observan que esta estrategia imita las funciones de las PNCs (163).

Otro estudio de Nurrohman y cols. en 2017 (164), que utilizó un precursor líquido inducido por polímeros (PILP) (165), mostró que la preservación de las proteínas de la matriz durante el proceso de desmineralización de la dentina, permite que se produzca mineralización dentro de la matriz desmineralizada, que puede estar asociada con la actividad de las PNCs; éstas pueden funcionar e inducir la mineralización debido a la presencia de inhibidores de proteasas, además de Ca^{2+} y PO_4^{3-} disponibles localmente (iones liberados durante el proceso de desmineralización). Aún así, este estudio puso de manifiesto que la suplementación con ASPA, en tratamientos de mineralización PILP (143), junto a inhibidores de proteasas, no mejoró los resultados en cuanto a la recuperación mecánica de la lesión. Las zonas externas de DAC “artificial” se recuperaron a aproximadamente el 60% ($\text{ER} = 9\text{-}11\text{ GPa}$) de los valores normales del módulo elástico de la DS ($\text{ER} = 18\text{-}20\text{ GPa}$), sin y con adiciones de inhibidores de proteasas. Los resultados de este estudio refrendan de alguna manera los nuestros, donde la ganancia de minerales no se corresponde del todo con la microdureza obtenida en los diferentes grupos.

Saxena y cols. en 2018 (166) partieron del supuesto del reconocimiento del proceso de mineralización PILP como válido para remineralizar las lesiones de DAC “artificial” a niveles similares a los de la DS (167), aunque si atendemos a sus

resultados de microdureza, se revela que los módulos de elasticidad de esas lesiones remineralizadas eran solo de aproximadamente el 50% de la DS (143), por eso, estos autores incorporaron en su estudio iones fluoruro y tuvieron mayor éxito en la remineralización PILP del colágeno tipo I con mejores resultados de microdureza.

Debemos recordar que alrededor del 70% del contenido mineral de la dentina es extrafibrilar. En consecuencia, mientras que los análogos polianiónicos-biomiméticos ayudan a formar minerales intrafibrilares, la extensión, organización e interacción de los cristales de apatita y el andamio de colágeno, puede resultar inadecuada para la recuperación completa de la estructura y la función. Por lo tanto, es necesario controlar tanto la formación de minerales como la organización de la matriz mineralizante. Chien y cols. (159) ya plantearon en 2017 el uso de péptidos sintéticos altamente simplificados, con poca complejidad compositiva o estructural, para sustituir a las PNCs en modelos de DAC “artificial”, consiguiendo un nivel notable de control sobre la remineralización de la lesión dentinaria. En este sentido, cabe volver a destacar el estudio publicado en 2020 de Zhou y cols (137), con muestras procedentes de DAC “artificial”, concluyendo que la remineralización con PC-PCA+TPP, el cual puede funcionar como primer biomimético y/o PNC, dio como resultado una remineralización extrafibrilar e intrafibrilar de la dentina.

Finalmente, hay que subrayar que un ambiente alcalino rico en minerales puede permitir la condensación de Si (OH)_4 y la precipitación de Ca^{2+} y PO_4^{3-} , que neutralizan el pH ácido, responsable de desplazar la reacción de disolución de equilibrio de hidroxiapatita (HA) hacia la desmineralización. La consecuencia es que se favorece la remineralización (155), y esto puede ayudar a fosilizar MMPs y cisteínas-catepsinas reduciendo su actividad proteolítica (11). Este hecho quizás pueda explicar por qué el colágeno se conservó en las muestras EXP analizadas en nuestro estudio (Fig. 47). En contraste, tenemos los dos cementos de silicato de calcio (BIO y MTA) que podrían haber reemplazado el colágeno por minerales a través de la degradación cáustica ($\text{pH}=13$), y por eso no se aprecia el colágeno.

5.4.2 Microscopía electrónica de transmisión (MET).

Nuestros resultados de MET confirmaron que era posible obtener una remineralización "de dentro-afuera" intrafibrilar, a través del material EXP en algunas, pero no en todas las zonas de la dentina desmineralizada. Creemos que esto fue posible debido a la presencia de dos análogos biomiméticos de remineralización (APA y TMP) en el primer experimental, en consonancia con los hallazgos de Zhou y cols en 2020 (137), donde, los resultados de MET revelaron que las fibrillas de colágeno del grupo de DAC “artificial” compuesto por TPP+PC-PCA presentaban bandas transversales periódicas tras 21 días de almacenamiento. La estructura de banda transversal periódica representa la apatita intrafibrilar dispuesta periódicamente, lo cual indica mineralización interfibrilar. Otros estudios basados en metodología PILP pusieron de manifiesto mediante MET la recuperación ultraestructural, de la DAC “artificial” a niveles similares a la DS (167).

Cabe destacar finalmente la conclusión de otros estudios respecto a la aplicación de análogos biomiméticos en el “primer”, los cuales promueven el depósito jerárquico intrafibrilar de cristales en forma de aguja, estabilizando las fuerzas de unión y reduciendo la microfiltración (42). Además, dicha remineralización biomimética, permite “rellenar” lentamente los espacios de agua residual en la CH, con cristales de apatita a través de grupos de prenucleación, para producir nanoprecusores de PCA estabilizados con polímeros (9,11,42,128,168).

No obstante, no podemos olvidar que un estudio MET no proporciona información sobre la recuperación de las propiedades físicas (remineralización funcional), y así no se puede tomar una decisión adecuada sobre el éxito real del tratamiento en cuestión. Además, recordemos que la dentina es un tejido hidratado, y sus propiedades se alteran significativamente cuando se deshidrata (141). La remineralización funcional, se basa en la recuperación de las propiedades mecánicas de la DAC bajo hidratación, similar a las propiedades de la DS. Por lo tanto, las mediciones de dureza deberían realizarse siempre en condiciones que

garanticen la hidratación completa de las muestras, tanto el proceso de preparación como medición (142).

6. Conclusiones.

6. CONCLUSIONES.

6.1 Objetivos específicos.

1. Evaluada la estabilidad adhesiva en el tiempo del adhesivo experimental frente a sistemas comerciales, concluimos que es más estable en un periodo de envejecimiento de 1 año en sus dos versiones de aplicación (ER y SE), aunque en el modo SE es superior y queda muy cerca de la significancia estadística.
2. Ha quedado manifiesta la capacidad remineralizante del adhesivo experimental sobre DAC “natural”, debido a la menor ratio Ca/P al año exhibida por el grupo EXP-SE.
3. Evaluado el comportamiento remineralizante del adhesivo experimental sobre DAC “artificial”, comparado al de otros sistemas comercializados, concluimos que es posible obtener una remineralización diferente, "de dentro-afuera" o biomimética intrafibrilar, a través del material EXP-SE en algunas, pero no en todas las zonas de la dentina desmineralizada.

6.2 Hipótesis nula.

En conclusión, a la luz de los datos y tras el resultado obtenido a través del contraste de hipótesis realizado, se dispuso de evidencia suficiente para poder rechazar la hipótesis nula de que no existe diferencia en la fuerza adhesiva y capacidad remineralizante, entre los sistemas comerciales estudiados y el adhesivo experimental, que contiene bioglass dopado con fluoruro y preparadores biomiméticos, cuando se emplean para restaurar DAC.

7. Perspectivas futuras.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS.

A través de experimentos “in vitro”, sigue siendo confuso emular y comprender el origen del PO_4^{3-} , y demás minerales que se depositan en el colágeno, así como las interacciones exactas entre los nanoprecusores y el colágeno que también son teóricas. Aunque la remineralización intrafibrilar de la DAC podría lograrse, la profundidad máxima de la dentina restaurada se limita a aproximadamente $10\mu\text{m}$ (169). Además, la mayoría de los estudios no consideran la participación de bacterias y biopelículas, que pueden inhibir tal remineralización biomimética.

Por otra parte, la mayoría de los experimentos de remineralización, tienen lugar en un entorno de fase líquida, lo que puede dificultar la aplicación clínica. Por lo tanto, la investigación futura no solo se limitará al laboratorio, sino que también se centrará en el uso y efecto clínico.

Uno de los principales desafíos del futuro para la reparación biomimética exitosa de tejidos mineralizados, es que haya una relación espacial y temporal íntima entre el mineral, el andamio y la matriz soluble, esto es crítico para lograr la ultraestructura de la matriz biomineral necesaria para esa función, no obstante, esa relación es poco conocida y difícil de recrear.

En definitiva, se requieren combinaciones de estudios “in vitro” e “in vivo” (170) con nuevos modelos experimentales para comprender los mecanismos y la aplicación clínica de la remineralización biomimética de la DAC, ya que actualmente podemos afirmar que la remineralización completa de las lesiones cariosas sigue siendo un gran desafío. Se requieren estrategias más completas, que incluyan parámetros biológicos adicionales, para proporcionar adhesivos dentales, que sean capaces de explotar al máximo los procesos de reparación de tejidos nativos y desencadenar la autocuración en la interfaz resina compuesta-diente (2) .

Esperamos que en un futuro próximo se desarrollen sistemas y/o adhesivos fluidos que puedan rellenar cualquier región de la CH con cristales de apatita, de modo que los enlaces resina-dentina sean autorremineralizables en tales condiciones y durar tanto como los enlaces resina-esmalte.



Fig. 49. Dr. Salvatore Sauro, Dr. Agustín Pascual Moscardó y D. Álvaro Ferrando Cascales trabajando en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental. Universidad de Valencia.

8. Bibliografía.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Obregón-Rodríguez N, Fernández-Riveiro P, Piñeiro-Lamas M, Smyth-Chamosa E, Montes-Martínez A, Suárez-Cunqueiro MM. Prevalence and caries-related risk factors in schoolchildren of 12- and 15-year-old: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2019;19(1):120.
2. Spencer P, Ye Q, Song L, Parthasarathy R, Boone K, Misra A, et al. Threats to adhesive/dentin interfacial integrity and next generation bio-enabled multifunctional adhesives. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2019;107(8):2673–83.
3. Nedeljkovic I, De Munck J, Vanloy A, Declerck D, Lambrechts P, Peumans M, et al. Secondary caries: prevalence, characteristics, and approach. *Clin Oral Investig*. 2020;24:683–91.
4. Simón-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol*. 2015;23(2):76–82.
5. Mertz-Fairhurst EJ, Ergle JW CJ. Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: results at year 10. *J Am Dent Assoc*. 1998;129(1):55–66.
6. Edelstein BL. The medical management of dental caries. *J Am Dent Assoc*. 1994;125(1):31–9.
7. Buonocore MG. A Simple Method of Increasing the Adhesion of Acrylic Filling Materials to Enamel Surfaces. *J Dent Res*. 1955;34(6):849–53.
8. Bowen RL. Adhesive bonding of various materials to hard tooth tissues. IV. Bonding to dentin, enamel, and fluorapatite improved by the use of a surface-active comonomer. *J Dent Res*. 1965;44(5):906–11.
9. Sauro S, Pashley DH. Strategies to stabilise dentine-bonded interfaces through remineralising operative approaches – State of The Art. *Int J Adhes Adhes*. 2016;69:39–57.
10. De Stefano Dorigo E, Breschi L, Di Lenarda R, Ruggeri A, Cadenaro M, Mazzoni A. Dental adhesion review: Aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*. 2007;24(1):90–101.
11. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldelli S, et al. Optimizing dentin bond durability: Control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater*. 2013;29(1):116–35.
12. Henostroza G. Adhesión en odontología restauradora. Brasil. 1ª Ed. Maio. 2003.
13. Kinney JH, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. The Importance of Intrafibrillar Mineralization of Collagen on the Mechanical Properties of Dentin. *J Dent Res*. 2003;82(12):957–61.
14. Breschi L, Maravic T, Cunha SR, Comba A, Cadenaro M, Tjäderhane L, et al. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dent Mater*. 2018;34(1):78–96.
15. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011;27(1):1–16.
16. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater*.

- 2011;27(1):17–28.
17. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol LS, Geraldini S, et al. Hydrolytic Degradation of the Hybrid Layer. 2014;29(10):999–1011.
18. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(6):525–30.
19. Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, et al. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability—A literature review. *Dent Mater.* 2016;32(2):41–53.
20. Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Horner JA, Matthews WG, Pashley DH. Nanoleakage: leakage within the hybrid layer. *Oper Dent.* 1995;20(1):18–25.
21. Hashimoto M, Ito S, Tay FR, Svizero NR, Sano H, Kaga M, et al. Fluid Movement across the Resin-Dentin Interface during and after Bonding. *J Dent Res.* 2004;83(11):843–8.
22. Tay FR, Hashimoto M, Pashley DH, Peters MC, Lai SCN, Yiu CKY, et al. Aging Affects Two Modes of Nanoleakage Expression in Bonded Dentin. *J Dent Res.* 2003;82(7):537–41.
23. Bertassoni LE. Dentin on the nanoscale: Hierarchical organization, mechanical behavior and bioinspired engineering. *Dent Mater.* 2017;33(6):637–49.
24. Craig R. *Materiales de Odontología Restauradora*. Madrid. 10ª Harcourt Brace; 1998.
25. Ohgushi K, Fusayama T. Electron Microscopic Structure of the Two Layers of Carious Dentin. *J Dent Res.* 1975;54(5):1019–26.
26. Fusayama T, K. O, Yamashita Y, Ichijo T. The Ultrastructure and Hardness of. *J Dent Res.* 1983;62(1):7–10.
27. Massler M. Pulpal reactions to dental caries. *Int Dent J.* 1967;17(2):441–60.
28. Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H. on Adhesive Performance of Functional Monomers. 2015;454–8.
29. Dobrovolski M, Loguercio AD, Gordillo LAA, Rodrigues Accorinte M de L, Zander-Grande C, Hass V, et al. Correlation between degree of conversion, resin–dentin bond strength and nanoleakage of simplified etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater.* 2013;29(9):921–8.
30. Dai L, Liu Y, Salameh Z, Khan S, Mao J, Pashley DH, et al. Can Caries-Affected Dentin be Completely Remineralized by Guided Tissue Remineralization? *Dent Hypotheses.* 2011;2(2):74.
31. García Ceballos L. Adhesión a dentina afectada por caries y dentina esclerótica. *Av Odontoestomatol.* 2004;20(2):71–8.
32. Yoshiyama M, Tay FR, Doi J, Nishitani Y, Yamada T, Itou K, et al. Bonding of Self-etch and Total-etch Adhesives to Carious Dentin. *J Dent Res.* 2002;81(8):556–60.
33. Nakajima M, Kunawarote S, Prasansuttiorn T, Tagami J. Bonding to caries-affected dentin. *Jpn Dent Sci Rev.* 2011;47(2):102–14.
34. Arrais CAG, Giannini M, Nakajima M, Tagami J. Effects of additional and extended acid etching on bonding to caries-affected dentine. *Eur J Oral Sci.*

- 2004;112(5):458–64.
35. Nakajima M, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Yoshiyama M, Ebisu S, et al. Tensile Bond Strength and SEM Evaluation of Caries-affected Dentin Using Dentin Adhesives. *J Dent Res.* 1995;74(10):1679–88.
 36. Habelitz S, Hsu T, Hsiao P, Saeki K, Chien Y-C, Marshall SJ, et al. The Natural Process of Biomineralization and In-Vitro Remineralization of Dentin Lesions. In: *Advances in bioceramics and biotechnologies II.* 2014. p. 13–24.
 37. Bettencourt AF, Neves CB, de Almeida MS, Pinheiro LM, Oliveira SA e, Lopes LP, et al. Biodegradation of acrylic based resins: A review. *Dent Mater.* 2010;26(5):171–80.
 38. Tezvergil-Mutluay A, Seseogullari-Dirihan R, Feitosa VP, Tay FR, Watson TF, Pashley DH, et al. Zoledronate and Ion-releasing Resins Impair Dentin Collagen Degradation. *J Dent Res.* 2014;93(10):999–1004.
 39. Sauro S, Osorio R, Watson TF, Toledano M. Influence of phosphoproteins' biomimetic analogs on remineralization of mineral-depleted resin-dentin interfaces created with ion-releasing resin-based systems. *Dent Mater.* 2015;31(7):759–77.
 40. Tay FR, Pashley DH. Biomimetic Remineralization of Resin-bonded Acid-etched dentin. *J Dent Res.* 2009;88(8):719–24.
 41. Pereira Isolan C, Isolan CP, Sarkis-Onofre R, Lima GS, Moraes RR. Bonding to Sound and Caries-Affected Dentin: A Systematic Review and Meta-Analysis Longevidad restauraciones View project Sealing ability of MTA and amalgam in different root-end preparations and resection bevel angles: An in vitro evaluation using margin. 2018;20(1):7–19.
 42. Abuna G, Feitosa VP, Correr AB, Cama G, Giannini M, Sinhoreti MA, et al. Bonding performance of experimental bioactive/biomimetic self-etch adhesives doped with calcium-phosphate fillers and biomimetic analogs of phosphoproteins. *J Dent.* 2016;52:79–86.
 43. Breschi L, Maravic T, Cunha SR, Comba A, Cadenaro M, Tjäderhane L, et al. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dent Mater.* 2018;34(1):78–96.
 44. Breschi L, Maravic T, Comba A, Cunha SR, Loguercio AD, Reis A, et al. Chlorhexidine preserves the hybrid layer in vitro after 10-years aging. *Dent Mater.* 2020;S0109-5641(20):30064–6.
 45. Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of Dentin MMPs in Caries Progression and Bond Stability. *J Dent Res.* 2015;94(2):241–51.
 46. Bertassoni LE, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. Mechanical recovery of dentin following remineralization in vitro — An indentation study. *J Biomech.* 2011;44(1):176–81.
 47. Liu Y, Kim Y-K, Dai L, Li N, Khan SO, Pashley DH, et al. Hierarchical and non-hierarchical mineralisation of collagen. *Biomaterials.* 2011;32(5):1291–300.
 48. Barbosa-Martins LF, de Sousa JP, Alves LA, Davies RPW, Puppin-Rontanti RM. Biomimetic mineralizing agents recover the micro tensile bond strength of demineralized dentin. *Materials (Basel).* 2018;11(9):1733.

49. Tay FR, Pashley DH. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. *Biomaterials*. 2008;29(8):1127–37.
50. Schwendicke F, Al-Abdi A, Pascual Moscardó A, Ferrando Cascales A, Sauro S. Remineralization effects of conventional and experimental ion-releasing materials in chemically or bacterially-induced dentin caries lesions. *Dent Mater*. 2019;35(5):772–9.
51. Barrancos Mooney J, Barrancos PJ. *Operatoria dental. Integración clínica*. Buenos Aires. Argentina . 5ª. Ed. Panamericana; 2007.
52. Wilson AD, Kent BE. A new translucent cement for dentistry. The glass ionomer cement. *Br Dent J*. 1972;132(4):133–5.
53. Sauro S, Faus-Matoses V, Makeeva I, Nuñez Martí JM, Gonzalez Martínez R, García Bautista JA, et al. Effects of Polyacrylic Acid Pre-Treatment on Bonded-Dentine Interfaces Created with a Modern Bioactive Resin-Modified Glass Ionomer Cement and Subjected to Cycling Mechanical Stress. *Materials (Basel)*. 2018;11(10):1884.
54. Nicholson JW. Adhesion of glass-ionomer cements to teeth: A review. *Int J Adhes Adhes*. 2016;69:33–8.
55. Khoroushi M, Keshani F. A review of glass-ionomers: From conventional glass-ionomer to bioactive glass-ionomer. *Dent Res J (Isfahan)*. 2013;10(4):411–20.
56. ten Cate JM, Buus MJ, Damen JJM. The Effects of Gic Restorations on Enamel and Dentin Demineralization and Remineralization. *Adv Dent Res*. 1995;9(4):384–8.
57. ten Cate JM, van Duinen RNB. Hypermineralization of Dentinal Lesions Adjacent to Glass-ionomer Cement Restorations. *J Dent Res*. 1995;74(6):1266–71.
58. Kim YK, Yiu CKY, Kim JR, Gu L, Kim SK, Weller RN, et al. Failure of a Glass Ionomer to Remineralize Apatite-depleted Dentin. *J Dent Res*. 2010;89(3):230–5.
59. Bjørndal L, Reit C, Bruun G, Markvart M, Kjaeldgaard M, Näsman P, et al. Treatment of deep caries lesions in adults: randomized clinical trials comparing stepwise vs. direct complete excavation, and direct pulp capping vs. partial pulpotomy. *Eur J Oral Sci*. 2010;118(3):290–7.
60. Sauro S, Watson T, Moscardó AP, Luzi A, Feitosa VP, Banerjee A. The effect of dentine pre-treatment using bioglass and/or polyacrylic acid on the interfacial characteristics of resin-modified glass ionomer cements. *J Dent*. 2018;73:32–9.
61. Sauro S, Watson TF, Thompson I, Banerjee A. One-bottle self-etching adhesives applied to dentine air-abraded using bioactive glasses containing polyacrylic acid: An in vitro microtensile bond strength and confocal microscopy study. *J Dent*. 2012;40(11):896–905.
62. Wang Z, Jiang T, Sauro S, Wang Y, Thompson I, Watson TF, et al. Dentine remineralization induced by two bioactive glasses developed for air abrasion purposes. *J Dent*. 2011;39(11):746–56.
63. Niu L, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen J, et al. Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater*. 2014;30(1):77–96.

64. Sauro S, Osorio R, Watson TF, Toledano M. Therapeutic effects of novel resin bonding systems containing bioactive glasses on mineral-depleted areas within the bonded-dentine interface. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23(6):1521–32.
65. Sauro S, Osorio R, Fulgêncio R, Watson TF, Cama G, Thompson I, et al. Remineralisation properties of innovative light-curable resin-based dental materials containing bioactive micro-fillers. *J Mater Chem B*. 2013;1(20):2624.
66. Berry EA, Powers JM. Bond strength of glass ionomers to coronal and radicular dentin. *Oper Dent*. 1994;19(4):122–6.
67. Sauro S, Watson TF, Mannocci F, Miyake K, Huffman BP, Tay FR, et al. Two-photon laser confocal microscopy of micropermeability of resin-dentin bonds made with water or ethanol wet bonding. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2008;90(1):327–37.
68. Toledano M, Sauro S, Cabello I, Watson T, Osorio R. A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface. *Dent Mater*. 2013;29(8):e142–52.
69. Qi Y, Li N, Niu L, Primus CM, Ling J-Q, Pashley DH, et al. Remineralization of artificial dentinal caries lesions by biomimetically modified mineral trioxide aggregate. *Acta Biomater*. 2012;8(2):836–42.
70. Atmeh AR, Chong EZ, Richard G, Festy F, Watson TF. Dentin-cement interfacial interaction: calcium silicates and polyalkenoates. *J Dent Res*. 2012;91(5):454–9.
71. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. *J Endod*. 2010;36(1):16–27.
72. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2003;31(1):3–23.
73. Van Landuyt KL, Krifka S, Hiller K-A, Bolay C, Waha C, Van Meerbeek B, et al. Evaluation of cell responses toward adhesives with different photoinitiating systems. *Dent Mater*. 2015;31(8):916–27.
74. Umwali A, Askar H, Paris S, Schwendicke F. Radiographic, antibacterial and bond-strength effects of radiopaque caries tagging. *Sci Rep*. 2016;6(1):27319.
75. Buskes JAKM, Christoffersen J, Arends J. Lesion Formation and Lesion Remineralization in Enamel under Constant Composition Conditions. *Caries Res*. 1985;19(6):490–6.
76. Schwendicke F, Eggers K, Meyer-Lueckel H, Dörfer C, Kovalev A, Gorb S, et al. In vitro induction of residual caries lesions in dentin: Comparative mineral loss and nano-hardness analysis. *Caries Res*. 2015;49(3):259–65.
77. Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, et al. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength — Evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater*. 1994;10(4):236–40.
78. Quintana AJ. Exposición sobre la Microscopía Electrónica de Barrido y el Microanálisis EDX , y el servicio que se proporciona en el edificio Severo

- Ochoa de la Universidad de Oviedo , con los microscopios JEOL JSM-6100 con microanálisis EDX Inca energy-200 y JEOL JS. 2011;1–15.
79. Pawley JB. Handbook of biological confocal microscopy. Springer; 2006. 985 p.
 80. Vicente JG. Fundamentos de la microrradiografía. Bol Soc Esp Ceram. 1966;5:641–60.
 81. Transmision MEDE, Electrones YDDE. Mocroscopía electrónica de transmisión y difracción de electrones de polímeros. Butlletí les Soc Catalanes Física, Química, Matemàtiques i Tecnol. 1991;11:161–73.
 82. Pashley DH, Nelson R, Pashley EL. In-vivo fluid movement across dentine in the dog. Arch Oral Biol. 1981;26(9):707–10.
 83. Hosaka K, Nakajima M, Yamauti M, Aksornmuang J, Ikeda M, Foxton RM, et al. Effect of simulated pulpal pressure on all-in-one adhesive bond strengths to dentine. J Dent. 2007;35(3):207–13.
 84. Nakajima M, Hosaka K, Yamauti M, Foxton RM, Tagami J. Bonding durability of a self-etching primer system to normal and caries-affected dentin under hydrostatic pulpal pressure in vitro. Am J Dent. 2006;19(3):147–50.
 85. Abdalla AI, ElSayed HY, García-Godoy F. Effect of hydrostatic pulpal water pressure on microtensile bond strength of self-etch adhesives to dentin. Am J Dent. 2008;21(4):233–8.
 86. Sano H, Chowdhury AFMA, Saikaew P, Matsumoto M, Hoshika S, Yamauti M. The microtensile bond strength test: Its historical background and application to bond testing. Jpn Dent Sci Rev. 2020;56(1):24–31.
 87. Meraji N, Nekoofar MH, Yazdi KA, Sharifian MR, Fakhari N, Camilleri J. Bonding to caries affected dentine. Dent Mater. 2018;34(9):236–45.
 88. Banerjee A, Kellow S, Mannocci F, Cook RJ, Watson TF. An in vitro evaluation of microtensile bond strengths of two adhesive bonding agents to residual dentine after caries removal using three excavation techniques. J Dent. 2010;38(6):480–9.
 89. Tezvergil-Mutluay A, Seseogullari-Dirihan R, Feitosa VP, Cama G, Brauer DS, Sauro S. Effects of Composites Containing Bioactive Glasses on Demineralized Dentin. J Dent Res. 2017;96(9):999–1005.
 90. Vidal Peiró P. Efecto de diversos tratamientos de superficie sobre la capacidad de adhesión de varios materiales de restauración CAD/CAM. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia. Valencia; 2015.
 91. Al-Abdi A, Paris S, Schwendicke F. Glass hybrid, but not calcium hydroxide, remineralized artificial residual caries lesions in vitro. Clin Oral Investig. 2017;21(1):389–96.
 92. Schwendicke F, Dörfer C, Kneist S, Meyer-Lueckel H, Paris S. Cariogenic Effects of Probiotic Lactobacillus rhamnosus GG in a Dental Biofilm Model. Caries Res. 2014;48(3):186–92.
 93. Marggraf T, Ganas P, Paris S, Schwendicke F. Bacterial reduction in sealed caries lesions is strain and material specific. Sci Rep. 2018;8(1):3767.
 94. Pashley DH. Dynamics of the Pulpo-Dentin Complex. Crit Rev Oral Biol Med. 1996;7(2):104–33.

95. Wong L, Sissions CH. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol.* 2001;46(6):477–86.
96. Ciucchi B, Bouillaguet S, Holz J, Pashley D. Dentinal fluid dynamics in human teeth, in vivo. *J Endod.* 1995;21(4):191–4.
97. Tariq U, Haider Z, Tufail K, Hussain R, Ali J, Bahru J. Determination of Calcium to Phosphate Ratio in Hydroxyapatite Extracted from Bovine Bone using LIBS. *Bul Opt.* 2016;2:48-53.
98. Hamama HH, Yiu CKY, Burrow MF, King NM. Chemical, morphological and microhardness changes of dentine after chemomechanical caries removal. *Aust Dent J.* 2013;58(3):283–92.
99. Banerjee A, Watson TF, Kidd EAM. Dentine Caries: Take It or Leave It? *Dent Update.* 2000;27(6):272–6.
100. Sattabanasuk V, Burrow MF, Shimada Y, Tagami J. Resin adhesion to caries-affected dentine after different removal methods. *Aust Dent J.* 2006;51(2):162–9.
101. Innes NPT, Frencken JE, Bjørndal L, Maltz M, Manton DJ, Ricketts D, et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Terminology. *Adv Dent Res.* 2016;28(2):49–57.
102. Banerjee A, Kidd EAM, Watson TF. In vitro validation of carious dentin removed using different excavation criteria. *Am J Dent.* 2003;16(4):228–30.
103. Saad A, Inoue G, Nikaido T, Ikeda M, Burrow MF, Tagami J. Microtensile Bond Strength of Resin-Modified Glass Ionomer Cement to Sound and Artificial Caries-Affected Root Dentin With Different Conditioning. *Oper Dent.* 2017;42(6):626–35.
104. Armstrong S, Geraldeli S, Maia R, Raposo LHA, Soares CJ, Yamagawa J. Adhesion to tooth structure: A critical review of “micro” bond strength test methods. *Dent Mater.* 2010;26(2):50–62.
105. Heintze SD. Clinical relevance of tests on bond strength, microleakage and marginal adaptation. *Dent Mater.* 2013;29(1):59–84.
106. Pashley DH, Sano H, Ciucchi B, Yoshiyama M, Carvalho RM. Adhesion testing of dentin bonding agents: A review. *Dent Mater.* 1995;11(2):117–25.
107. Goracci C, Sadek FT, Monticelli F, Cardoso PE., Ferrari M. Influence of substrate, shape, and thickness on microtensile specimens’ structural integrity and their measured bond strengths. *Dent Mater.* 2004;20(7):643–54.
108. Liliana M, Enciso P. Microtensión en Tejidos Dentarios Duros : Desarrollo Tecnológico Microtensión en Tejidos Dentarios Duros : Desarrollo Tecnológico. Facultad de Odontología. Departamento de Salud Oral. Bogotá. Univesidad Nacional de Colombia. 2015.
109. Armstrong S, Breschi L, Özcan M, Pfefferkorn F, Ferrari M, Van Meerbeek B. Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μ TBS) approach. *Dent Mater.* 2017;33(2):133–43.
110. Schwendicke F, Eggers K, Meyer-Lueckel H, Dörfer C, Kovalev A, Gorb S, et al. In vitro Induction of Residual Caries Lesions in Dentin: Comparative Mineral Loss and Nano-Hardness Analysis. *Caries Res.* 2015;49(3):259–65.

111. Silva NRFA, Carvalho RM, Pegoraro LF, Tay FR, Thompson VP. Evaluation of a Self-limiting Concept in Dentinal Caries Removal. *J Dent Res*. 2006;85(3):282–6.
112. Emara R, Elhennawy K, Schwendicke F. Effects of calcium silicate cements on dental pulp cells: A systematic review. *J Dent*. 2018;77:18–36.
113. Erhardt MCG, Toledano M, Osorio R, Pimenta LA. Histomorphologic characterization and bond strength evaluation of caries-affected dentin/resin interfaces: effects of long-term water exposure. *Dent Mater*. 2008;24(6):786–98.
114. Par M, Tarle Z, Hickel R, Ilie N. Dentin bond strength of experimental composites containing bioactive glass: Changes during aging for up to 1 year. *J Adhes Dent*. 2018;20(4):325–34.
115. Wang Y, Spencer P, Walker MP. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *J Biomed Mater Res Part A*. 2007;81A(2):279–86.
116. Zenobi W, Feitosa VP, Moura MEM, D'arcangelo C, Rodrigues LK de A, Sauro S. The effect of zoledronate-containing primer on dentin bonding of a universal adhesive. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018;77:199–204.
117. Sauro S, Toledano M, Aguilera FS, Mannocci F, Pashley DH, Tay FR, et al. Resin-dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding. *Dent Mater*. 2010;26(4):368–79.
118. Marshall Jr GW, Chang YJ, Gansky SA, Marshall SJ. Demineralization of caries-affected transparent dentin by citric acid: an atomic force microscopy study. *Dent Mater*. 2001;17(1):45–52.
119. Tekçe N, Tuncer S, Demirci M, Pashaev D. The bonding effect of adhesive systems and bulk-fill composites to sound and caries-affected dentine. *J Adhes Sci Technol*. 2016;30(2):171–85.
120. Tjäderhane L, Buzalaf MAR, Carrilho M, Chaussain C. Matrix metalloproteinases and other matrix proteinases in relation to cariology: The era of “dentin degradomics.” *Caries Res*. 2015;49(3):193–208.
121. El Gezawi M, Haridy R, Abo Elazm E, Al-Harbi F, Zouch M, Kaisarly D. Microtensile bond strength, 4-point bending and nanoleakage of resin-dentin interfaces: Effects of two matrix metalloproteinase inhibitors. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018;78:206–13.
122. Sauro S, Makeeva I, Faus-Matoses V, Foschi F, Giovarruscio M, Maciel Pires P, et al. Effects of Ions-Releasing Restorative Materials on the Dentine Bonding Longevity of Modern Universal Adhesives after Load-Cycle and Prolonged Artificial Saliva Aging. *Materials (Basel)*. 2019;12(5):722.
123. Lee H-S, Berg JH, García-Godoy F, Jang K-T. Long-term evaluation of the remineralization of interproximal caries-like lesions adjacent to glass-ionomer restorations: A micro-CT study. *Quintessence Int (Berl)*. 1992;23:143–7.
124. Fernando D, Attik N, Pradelle-Plasse N, Jackson P, Grosogogeat B, Colon P. Bioactive glass for dentin remineralization: A systematic review. *Mater Sci Eng C*. 2017;76:1369–77.
125. Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater*. 2015;23:53–82.

126. Efflandt SE, Magne P, Douglas WH FL. Interaction between bioactive glasses and human dentin. *J Mater Sci Mater Med*. 2002;13(6):557–65.
127. Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater*. 2015;23:53–82.
128. Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011;32(11):2757–74.
129. Neel EAA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM, et al. Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:4743–63.
130. Groh D, Döhler F, Brauer DS. Bioactive glasses with improved processing. Part 1. Thermal properties, ion release and apatite formation. *Acta Biomater*. 2014;10(10):4465–73.
131. Mneimne M, Hill RG, Bushby AJ, Brauer DS. High phosphate content significantly increases apatite formation of fluoride-containing bioactive glasses. *Acta Biomater*. 2011;7(4):1827–34.
132. Kato MT, Bolanho A, Zarella BL, Salo T, Tjäderhane L, Buzalaf MAR. Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res*. 2014;93(1):74–7.
133. Brackett MG, Agee KA, Brackett WW, Key WO, Sabatini C, Kato MT, et al. Effect of Sodium Fluoride on the endogenous MMP Activity of Dentin Matrices. *J Nat Sci*. 2015;1(6):118.
134. Mei ML, Ito L, Cao Y, Li QL, Chu CH, Lo ECM. The inhibitory effects of silver diamine fluorides on cysteine cathepsins. *J Dent*. 2014;42(3):329–35.
135. Feitosa VP, Ogliari FA, Van Meerbeek B, Watson TF, Yoshihara K, Ogliari AO, Sinhoreti MA, Correr AB, Cama G SS. Can the hydrophilicity of functional monomers affect chemical interaction? *J Dent Res*. 2014;93(2):201–6.
136. Feitosa VP, Leme AA, Sauro S, Correr-Sobrinho L, Watson TF, Sinhoreti MA, et al. Hydrolytic degradation of the resin-dentine interface induced by the simulated pulpal pressure, direct and indirect water ageing. *J Dent*. 2012;40(12):1134–43.
137. Zhou Z, Ge X, Bian M, Xu T, Li N, Lu J, et al. Remineralization of dentin slices using casein phosphopeptide – amorphous calcium phosphate combined with sodium tripolyphosphate. *Biomed Eng Online*. 2020;19(1):18.
138. Ryou H, Niu L-N, Dai L, Pucci CR, Arola DD, Pashley DH, et al. Effect of Biomimetic Remineralization on the Dynamic Nanomechanical Properties of Dentin Hybrid Layers. *J Dent Res*. 2011;90(9):1122–8.
139. Liu Y, Li N, Qi Y, Niu L, Elshafiy S, Mao J, et al. The use of sodium trimetaphosphate as a biomimetic analog of matrix phosphoproteins for remineralization of artificial caries-like dentin. *Dent Mater*. 2011;27(5):465–77.
140. Garcia IM, Leitune VCB, Samuel SMW CF. Influence of Different Calcium Phosphates on an Experimental Adhesive Resin. *J Adhes Dent*. 2017;19(5):379–384.
141. Bertassoni LE, Habelitz S, Kinney JH, Marshall SJ, Marshall Jr. GW. Biomechanical Perspective on the Remineralization of Dentin. *Caries Res*.

- 2009;43(1):70–7.
142. Braga RR, Habelitz S. Current Developments on Enamel and Dentin Remineralization. *Curr Oral Heal Reports*. 2019;6(4):257–63.
 143. Burwell AK, Thula-Mata T, Gower LB, Habeliz S, Kurylo M, Ho SP, et al. Functional Remineralization of Dentin Lesions Using Polymer-Induced Liquid-Precursor Process. *PLoS One*. 2012;7(6):38852.
 144. Gu L, Huffman BP, Arola DD, Kim YK, Mai S, Elsalanty ME, et al. Changes in stiffness of resin-infiltrated demineralized dentin after remineralization by a bottom-up biomimetic approach. *Acta Biomater*. 2010;6(4):1453–61.
 145. Banerjee A, Sherriff M, Kidd EAM, Watson TF. A confocal microscopic study relating the autofluorescence of carious dentine to its microhardness. *Br Dent J*. 1999;187(4):206–10.
 146. Schwendicke F, Frencken JE, Bjørndal L, Maltz M, Manton DJ, Ricketts D, et al. Managing Carious Lesions. *Adv Dent Res*. 2016;28(2):58–67.
 147. Sezinando A. Looking for the ideal adhesive - A review. *Rev Port Estomatol Med Dent e Cir Maxilofac*. 2014;55(4):194–206.
 148. Kim YK, Yiu CKY, Kim JR, Gu L, Kim SK, Weller RN, et al. Failure of a Glass Ionomer to Remineralize Apatite-depleted Dentin. *J Dent Res*. 2010;89(3):230–5.
 149. Tanumiharja M, Burrow MF, Cimmino A, Tyas MJ. The evaluation of four conditioners for glass ionomer cements using field-emission scanning electron microscopy. *J Dent*. 2001;29(2):131–8.
 150. Inoue G, Tsuchiya S, Nikaido T, Foxton RM, Tagami J. Morphological and mechanical characterization of the acid-base resistant zone at the adhesive-dentin interface of intact and caries-affected dentin. *Oper Dent*. 2006;31(4):466–72.
 151. Nikaido T, Weerasinghe DDS, Waidyasekera K, Inoue G, Foxton RM, Tagami J. Assessment of the nanostructure of acid-base resistant zone by the application of all-in-one adhesive systems: Super dentin formation. *Biomed Mater Eng*. 2009;19(2–3):163–71.
 152. Hamama H, Yiu C, Burrow MF. Effect of chemomechanical caries removal on bonding of resin-modified glass ionomer cement adhesives to caries-affected dentine. *Aust Dent J*. 2015;60(2):190–9.
 153. Pinna R, Maioli M, Eramo S, Mura I, Milia E. Carious affected dentine: Its behaviour in adhesive bonding. *Aust Dent J*. 2015;60(3):276–93.
 154. Profeta AC, Mannocci F, Foxton RM, Thompson I, Watson TF, Sauro S. Bioactive effects of a calcium/sodium phosphosilicate on the resin-dentine interface: a microtensile bond strength, scanning electron microscopy, and confocal microscopy study. *Eur J Oral Sci*. 2012;120(4):353–62.
 155. Zhou W, Liu S, Zhou X, Hannig M, Rupf S, Feng J, et al. Modifying adhesive materials to improve the longevity of resinous restorations. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3).
 156. Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT. The Biomineralization Ability of Mineral Trioxide Aggregate and Portland Cement on Dentin Enhances the Push-out Strength. *J Endod*. 2010;36(2):286–91.
 157. Kemp GD, Tristram GR. The preparation of an alkali-soluble collagen from

- demineralized bone. *Biochem J.* 1971;124(5):915–9.
158. Kawasaki K, Ruben J, Stokroos I, Takagi O, Arends J. The Remineralization of EDTA-Treated Human Dentine. *Caries Res.* 1999;33(4):275–80.
 159. Chien YC, Tao J, Saeki K, Chin AF, Lau JL, Chen CL, et al. Using Biomimetic Polymers in Place of Noncollagenous Proteins to Achieve Functional Remineralization of Dentin Tissues. *ACS Biomater Sci Eng.* 2017;3(12):3469–79.
 160. Jee S-S, Thula TT, Gower LB. Development of bone-like composites via the polymer-induced liquid-precursor (PILP) process. Part 1: Influence of polymer molecular weight. *Acta Biomater.* 2010;6(9):3676–86.
 161. Kim J, Gu L, Breschi L, Tjäderhane L, Choi KK, Pashley DH, et al. Implication of Ethanol Wet-bonding in Hybrid Layer Remineralization. *J Dent Res.* 2010;89(6):575–80.
 162. Pacheco LF, Banzi EC de F, Rodrigues E, Soares LES, Pascon FM, Correr-Sobrinho L, et al. Molecular and Structural Evaluation of Dentin Caries-Like Lesions Produced by Different Artificial Models. *Braz Dent J.* 2013;24(6):610–8.
 163. Cao Y, Liu W, Ning T, Mei ML, Li Q-L, Lo ECM, et al. A novel oligopeptide simulating dentine matrix protein 1 for biomimetic mineralization of dentine. *Clin Oral Investig.* 2014;18(3):873–81.
 164. Nurrohman H, Carneiro KMM, Hellgeth J, Saeki K, Marshall SJ, Marshall GW, et al. The role of protease inhibitors on the remineralization of demineralized dentin using the PILP method. *PLoS One.* 2017;12(11):188–277.
 165. Osorio R, Toledano M. Biomaterials for Catalysed Mineralization of Dental Hard Tissues. In: *Biomaterialization and Biomaterials: Fundamentals and Applications.* Elsevier Inc.; 2016. p. 365–76.
 166. Saxena N, Cremer MA, Dolling ES, Nurrohman H, Habelitz S, Marshall GW, et al. Influence of fluoride on the mineralization of collagen via the polymer-induced liquid-precursor (PILP) process. *Dent Mater.* 2018;34(9):1378–90.
 167. Saeki K, Chien YC, Nonomura G, Chin AF, Habelitz S, Gower LB, et al. Recovery after PILP remineralization of dentin lesions created with two cariogenic acids. *Arch Oral Biol.* 2017;82:194–202.
 168. Gu L, Kim J, Kim YK, Liu Y, Dickens SH, Pashley DH, et al. A chemical phosphorylation-inspired design for Type I collagen biomimetic remineralization. *Dent Mater.* 2010;26(11):1077–89.
 169. He L, Hao Y, Zhen L, Liu H, Shao M, Xu X, et al. Biomaterialization of dentin. *J Struct Biol.* 2019;207(2):115–22.
 170. Han M, Li QL, Cao Y, Fang H, Xia R, Zhang ZH. In vivo remineralization of dentin using an agarose hydrogel biomimetic mineralization system. *Sci Rep.* 2017;7:41955.

9. Glosarios.

9. GLOSARIOS.

9.1 GLOSARIO DE ABREVIATURAS (orden alfabético).

1. APA: ácido poliacrílico.
2. APVP: ácido polivinilfosfónico.
3. ASPA: ácido poliaspártico.
4. AU: adhesivo universal.
5. AU-SE: adhesivo universal modo autograbante.
6. BAG-F: bioglass dopado con fluoruro.
7. BIO: biodentine.
8. CIV: cemento de vidrio ionómero.
9. CIVMR: cemento de vidrio ionómero modificado con resina.
10. CH: capa híbrida.
11. D1: lesión cariosa artificial superficial producida por medios ácidos.
12. D2: lesión cariosa artificial profunda producida por medios ácidos.
13. D3: lesión cariosa artificial profunda inducida por bacterias.
14. DAC: dentina afectada por caries.
15. DE: dentina esclerótica.
16. DI: dentina infectada.
17. DS: dentina sana.
18. EDX: espectroscopia de rayos X de energía dispersiva
19. ER: etch and rinse o grabado y enjuague.
20. EXP: experimental.
21. EXP-ER: experimental modo grabado y enjuague.
22. EXP-SE: experimental modo autograbante.
23. GDMA-P: dimetacrilato de glicerol-fosfato.
24. GIC: Glass Ionomer Cement.
25. HEMA: metacrilato de hidroxietilo.
26. MEB: microscopía electrónica de barrido.
27. MET: microscopía electrónica de transmisión.
28. MTA: agregado de trióxido mineral.
29. MRT: microrradiografía transversal.
30. MMPs: metaloproteinasas de la matriz.
31. OCP: octacalciofosfato.
32. OMS: organización mundial de la salud.
33. OPT: optibond FL.
34. PCA: fosfato de calcio metaestable.
35. PC: fosfato de caseína
36. PNCs: proteínas no colágenas.
37. STP: solución salina tamponada con fosfato.
38. RMGIC: Resin Modified Glass Ionomer Cement.
39. SDR: composite bulk-fill.
40. SE: self-etching o autograbante.

- 41. SEM: Scanning Electron Microscopy.
- 42. TEGDMA: trietilenglicol-dimetacrilato.
- 43. TEM: Transmission Electron Microscopy.
- 44. TMP: trimetafosfato.
- 45. TMR: Transverse Microradiography.
- 46. TPP: tripolifosfato de sodio.
- 47. T0: tiempo 0 o basal.
- 48. T1: tiempo 1 año.
- 49. UDMA: dimetacrilato de uretano.
- 50. AU: Universal Adhesive.
- 51. UA-SE: Universal Adhesive Self-Etch.
- 52. VHN: vickers.
- 53. VB: vidrio bioactivo
- 54. VB-APA: vidrio bioactivo con ácido poliacrílico.
- 55. μ TBM: microtensión.
- 56. α -TCP: alfa tricalciofosfato.

9.2 GLOSARIO DE TÉRMINOS.

1. Cross-linkers: en química y biología, un enlace cruzado (cross-link) es un enlace que une una cadena de polímero a otra. Estos enlaces pueden tomar la forma de enlaces covalentes o enlaces iónicos y los polímeros pueden ser polímeros sintéticos o polímeros naturales como proteínas.

2. Metalización: si un material no lo es por su naturaleza, como es el caso de la mayor parte de los materiales, se le hace previamente a su observación una preparación, recubriendo esta superficie con una película muy fina de material conductor, normalmente oro o grafito, de sólo unos pocos nm de espesor para evitar su interferencia en la observación.

3. Coeficiente de Poisson : (denotado mediante la letra griega (ν) es una [constante elástica](#) que proporciona una medida del estrechamiento de sección de un prisma de material elástico lineal e isótropo cuando se estira longitudinalmente y se adelgaza en las direcciones perpendiculares a la de estiramiento. El nombre de dicho coeficiente se le dio en honor al físico francés [Simeon Poisson](#).

4. Módulo de Young: o módulo de elasticidad longitudinal es un parámetro que caracteriza el comportamiento de un [material elástico](#), según la dirección en la que se aplica una fuerza. Este comportamiento fue observado y estudiado por el científico inglés del siglo XIX [Thomas Young](#). Para un [material elástico lineal](#) e [isótropo](#), el módulo de Young tiene el mismo valor para una [tracción](#) que para una [compresión](#), siendo una constante independiente del esfuerzo siempre que no exceda de un valor máximo denominado [límite elástico](#), y es siempre mayor que cero: si se tracciona una barra, aumenta de longitud.

5. Estequiometría: la estequiometría es la ciencia que mide las proporciones cuantitativas o relaciones de masa de los elementos químicos que están implicados en una reacción química. También estudia la proporción de los distintos elementos en un compuesto químico y la composición de mezclas químicas.

6. Microdifracción: esta técnica se basa en hacer incidir un haz de rayos-x sobre un monocristal de algún compuesto químico. En un monocristal los átomos están dispuestos de forma periódica en las tres dimensiones del espacio y, cuando un haz de rayos-x incide sobre ellos, actúan como fuentes secundarias y reemiten los rayos-x en todas direcciones. La diferencia de caminos ópticos recorridos por los rayos-x da lugar a fenómenos de interferencia y el resultado final es que el rayo incidente se separa en rayos difractados. Con un detector de rayos-x se mide la dirección en la que han salido los rayos difractados y su intensidad, pero se pierde la información sobre su fase. Un tratamiento matemático complejo de los datos medidos, realizado con ordenador, permite reconstruir la imagen del monocristal.

10.1 Anexo 1.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.intl.elsevierhealth.com/journals/dema

Remineralization effects of conventional and experimental ion-releasing materials in chemically or bacterially-induced dentin caries lesions

Falk Schwendicke^{a,*,1}, Allam Al-Abdi^{a,1}, Agustín Pascual Moscardó^b,
Alvaro Ferrando Cascales^b, Salvatore Sauro^c

^a Department of Operative and Preventive Dentistry, Charité — Universitätsmedizin Berlin, Aßmannshauser Str. 4-6, 14197 Berlin, Germany

^b Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

^c Departamento de Odontología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad CEU-Cardenal Herrera, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 December 2018

Accepted 13 February 2019

Keywords:

Microhardness

Simulated caries lesion

Dentin

Transverse microradiography

Microscopy

ABSTRACT

Objectives. The aim of this study was to evaluate the remineralization effects of conventional and experimental ion-releasing materials on different artificial dentin carious lesions.

Methods. Forty human dentin discs were submitted to different demineralization protocols for simulated caries lesion: (D1) Shallow chemically-induced caries, (D2) deep chemically-induced caries, (D3) deep bacterially-induced caries. Each disc was divided in five parts; one of those served as baseline control. The remaining parts of each disc ($n = 12\text{--}16/\text{group}$) were treated using the following materials: EXP, an experimental resin-based bioactive material consisting of a self-etch primer and an adhesive containing a fluoride-doped bioglass; GIC, a glass ionomer cement (Riva LC); MTA, Mineral Trioxide Aggregate (ProRoot MTA); BIO, a calcium silicate cement (Biodentine). Specimens were mounted in a dual-chamber device to simulate the exposure to pulpal pressure and oral fluids. After 3 months, mineral and mechanical gains were assessed using transverse microradiography ($\text{vol}\% \times \mu\text{m}$) and microhardness measurements (VHN). Characterization using confocal microscopy and transmission electron microscopy (TEM) was also performed.

Results. All four restorative materials induced mineral gains regardless of the protocol for caries lesion, without significant differences between materials. Microhardness significantly increased in the groups BIO and MTA, but not GIC; EXP only provided hardness gains in D3-lesions. Fluorescence and confocal microscopy confirmed these results. There was a clear “top-down” remineralization in the groups BIO and MTA, and “bottom-up” intrafibrillar collagen remineralization in EXP.

Significance. Mineral gains did not always translate into hardness gains. Biodentine and MTA induced evident mineral precipitation, but intra/inter-fibrillar collagen mineral infiltration was only provided by biomimetic remineralisation via the use of the experimental adhesive. Complete remineralization of caries lesions remains a challenge.

© 2019 The Academy of Dental Materials. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author.

E-mail address: falk.schwendicke@charite.de (F. Schwendicke).

¹ These authors are shared first authors.

<https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.02.021>

0109-5641/© 2019 The Academy of Dental Materials. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Removal of carious tissue in deep dentin lesions comes with a significant risk of pulp exposure. Hence, selective carious tissue removal is recommended for deep lesions. During this selective removal, only hard dentin remains along the walls of the cavity, whereas demineralized, bacterially-contaminated dentin is left in pulpal areas and sealed beneath the restoration [1].

Conventional adhesives achieve low bond strengths when applied to such demineralized or contaminated dentin, as this layer of carious dentin can be only partially infiltrated by resin monomers. Such a “poorly” resin-infiltrated demineralized dentin is prone to hydrolytic and/or enzymatic degradation, which may eventually compromise the durability of composite restorations [2,3]. Contemporary caries management attempts to remineralise the sealed carious lesion through the use of ions-releasing dental materials (e.g. liners, bioactive adhesives and restoration materials), in addition to “natural” mineral gains mediated by odontoblasts and/or mineral-containing pulpal fluids [4–6].

While calcium hydroxide, the most common lining material, seems only limitedly able to provide mineral gains, alternative materials like glass ionomer cements (GIC) [7–13], mineral trioxide aggregate (MTA) or novel calcium silicate cements have been advocated to increase the mineral content of lesions sealed beneath them [14]. More recently, experimental bioactive/biomimetic adhesives have been advocated to induce slow displacement of the residual water from water-filled voids within the incompletely infiltrated hybrid layer, via infiltration of collagen with nano-crystals of apatite, leading to recovery of mechanical properties and protection of collagen against proteolytic degradation [8,11,8–13].

The aim of this study was to evaluate the remineralization effects of conventional and experimental ion-releasing materials in chemically or bacterially-induced dentin caries lesions *in vitro*. This aim was accomplished by performing mineral content measurement (transverse microradiography), microhardness determination (Vickers Hardness, VHN) as well as confocal microscopy and transmission electron microscopy (TEM) ultra-morphology analysis. Our null-hypothesis was that the remineralisation assessed through transverse microradiography and microhardness would not differ significantly between the different materials tested in this study.

2. Materials and Methods

2.1. Study design

The study design is summarised in Fig. 1. The remineralization activity of four different ion-releasing materials applied onto artificial dentin carious lesions was tested in a dual-chamber device [14]. This device allowed simultaneous simulation of pulpal fluid flows onto the pulpal side of the carious dentin disc as well as possible remineralization from there, and restorative effects from the coronal side of the disc. Three types of artificial demineralized carious lesions were induced in human dentin discs: (D1) Shallow chemically induced

lesions, (D2) deep chemically induced lesions, (D3) deep bacterially induced lesions. Baseline mineral loss was measured through transverse microradiography, and baseline surface microhardness determined. Dentin discs were restored (covered) using three conventional ion-releasing materials (GIC, MTA, Biodentine) or an experimental bioactive/biomimetic resin-based adhesive system. The specimens were subsequently exposed to cyclic artificial saliva and fluoride rinses for a period of 12 weeks. Afterwards, transverse microradiography and microhardness measurements were repeated. Moreover, three representative specimens from each group were selected and analyzed through TEM and confocal microscope.

2.2. Sample preparation

Forty extracted human permanent molars, devoid of any lesions and/or restorations, were obtained with an informed consent based on an ethical approved protocol (ethics committee of the Charité — Universitätsmedizin Berlin EA4/102/14). Both roots and coronal enamel were removed (Band Saw 300 cl; Exakt Apparatebau, Norderstedt, Germany) until the deep dentin was reached (the final disc consisted of 1.5 mm residual dentin measured using a C-calliper). Discs were plan-parallelised and polished using SiC abrasive papers 1200, 2400 and 4000 SiC (Mikroschleifsystem 400 CS). The specimens were covered with acid-resistant nail varnish (Maybelline, New York, NY, USA) leaving a round window (5 mm diameter) on the occlusal surface; this latter was left uncovered.

Three types of artificial carious lesions were created in this unprotected window following different validated protocols [15–17]: (D1) Shallow chemically induced lesions ($n = 12$). These were created via storing the samples in 5 l of a demineralising solution (pH 5.3, 37 °C) containing 50 mM acetic acid, 3 mM $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 3 mM KH_2PO_4 and 6 mM methyl-hydroxydiphosphonate for 14 days. The pH of the solution was monitored daily (InLab micro, Mettler-Toledo, Giessen, Germany) and if necessary adjusted using HCl or 10 M KOH. Chemicals (except HCl) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA), HCl was purchased from Roth (Karlsruhe, Germany). (D2) Deep chemically induced lesions ($n = 12$). These were created via storing the samples in the same acetic acid solution for 28 days. (D3) Bacterially induced deep lesions ($n = 16$). These were first demineralized in the solution of acetic acid for 7 d, followed by bacterial demineralization. For the latter, a computer-controlled continuous-culture biofilm model was used [18]. *Lactobacillus rhamnosus* (DSM 20247, DSMZ, Braunschweig, Germany) was cultured overnight in deMan-Rogosa-Sharpe (MRS) medium (Roth) at 37 °C. Cultures were then transferred to the biofilm model, where they were provided with MRS supplemented with 2% glucose via peristaltic multi-canal pumps (8152 Standard, MCP, Glattbrugg, Germany) for 10 min four times daily for a total of 2 days. Between simulated meals, biofilms were cultured at rest at 37 °C under 100% humidity. Finally, the biofilm was removed using a sterile swap, the specimens were well rinsed, the nail varnish completely removed from the coronal and pulpal surfaces [19], and from each disc, a perpendicular section was cut as baseline

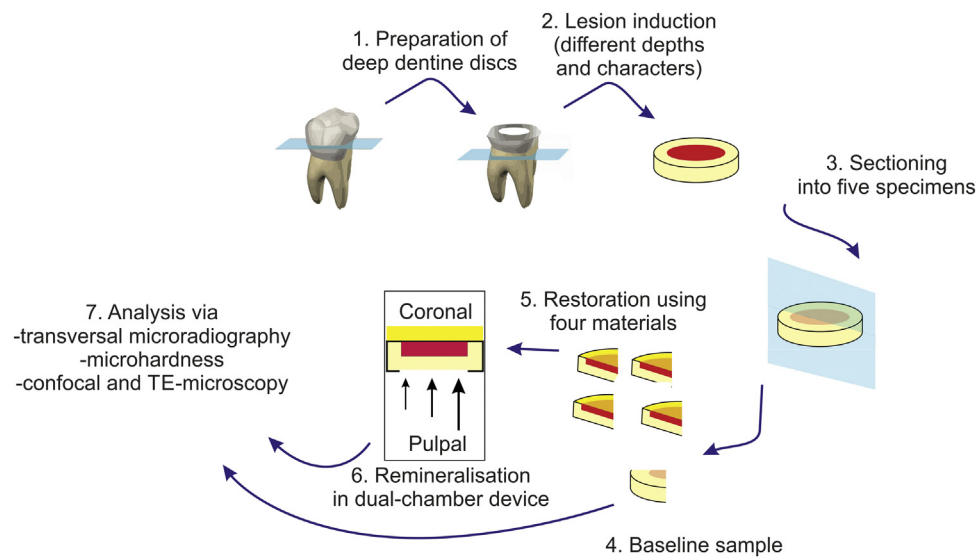


Fig. 1 – Schematic representation of the study design.

control. The remaining disc was cut into four experimental samples, each being restored with one different material.

2.3. Restorative materials

The following materials were tested in this study: (1) A glass ionomer cement (GIC), Riva LC (Riva, SDI, Bayswater, Australia). The GIC was not covered by any further material. (2) An experimental adhesive system (EXP) made of a self-etching primer (containing urethane dimethylacrylate (UDMA), hydroxyethyl methacrylate (HEMA), triethylene glycole-dimethacrylate (TEGDMA), glycerol dimethacrylate phosphate (GDMA-P), and ethoxylated bisphenol A dimethacrylate (Bis-EMA) and an adhesive containing UDMA, TEGDMA, HEMA, Bis-EMA and 50 w% fluoride-bioglass [20] (<50 μm particle size). All monomers used for the formulation of the experimental adhesive were purchased from Esstech (Essington, Pennsylvania, USA). The primer was applied onto dentin for 15 s, air-dried for 5 s to remove the solvent, and then covered with a layer of adhesive applied for 15 s. This latter was then air-dried to remove the excess deposited on the dentin surface and light-cured for 20 s with an LED-light-curing with an intensity of >1000 mW/cm^2 (Smartlite, Dentsply, Konstanz, Germany). Subsequently, a flowable composite (Tetric EvoFlow, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) was placed in a 2 mm thick layer using the same curing protocol. (3) Biodentine (BIO, Septodont, Niederkassel, Germany), a tricalcium silicate cement that was mixed as per manufacturer's instructions and placed in a thin layer of 0.5–1.0 mm thickness. The cement was covered with a wet cotton pellet and left undisturbed for 15 min to achieve a proper setting reaction. Subsequently, these specimens were covered using a commercial adhesive (Clearfil SE Bond, Kuraray, Tokyo, Japan) applied according to manufacturer's instructions, followed by a flowable resin composite (Tetric EvoFlow), as previously described. (4) ProRoot MTA (MTA, Dentsply), mixed as per manufacturer's instructions and placed in a thin layer of 0.5–1.0 mm thickness. Also, this cement was covered with a wet cotton pellet and left

undisturbed for 15 min. Finally, the specimens were restored as described above for group 3 (BIO).

2.4. Remineralization phase

Specimens were mounted on the lit of a custom-made dual-chamber system (Fig. 1), with pulpal and coronal surfaces being exposed two different chambers [14]. The use of this system allows to simultaneously provide remineralization from coronally (induced by the materials) and pulpal mineral delivery, as is the case clinically [21]. The coronal chamber was filled with a mucin-based medium to simulate the oral milieu [22]. Every 2 weeks, the coronal surfaces all the specimens were additionally rinsed with 200 ppm NaF solution for 5 min to allow possible fluoride recharge of GIC and to simulate a real scenario where toothpastes and/or mouthrinses are used. The pulpal chamber was immersed in simulated pulpal fluid (containing hepes buffer, calcium, magnesium, phosphate, as well as albumin) at a constant pulpal pressure of 2.94 kPa [14,23]. Chambers were stored at 37 °C and under gentle agitation (70 rpm) for three months, with coronal and pulpal fluids being replaced every two weeks.

2.5. Transverse microradiography (TMR)

Microradiography was used to estimate the integrated mineral loss (ΔZ) of the baseline samples and of the remineralized samples. From each microradiograph, three standardized areas were used to determine mineral loss. Absolute mineral loss differences ($\Delta\Delta Z$) were calculated for each area, with positive differences indicating mineral gains, and means for each sample used for statistical analysis.

A nickel-filtered copper X-ray source (PW 1730/10, Philips, Eindhoven, The Netherlands) operating at 20 kV and 10 mA with a vertical tube (PW 2213/20, Panalytical, Kassel) and a 280 mm radiation-to-film distance was used to obtain radiographs. Films (Fuji fine 71337, Fujifilm, Tokyo, Japan) were exposed for 5 s and developed under standardized

conditions according to the manufacturer's recommendations. The microradiographs were analyzed with a digital-image-analysing system (XC 77 CE, Sony, Tokyo, Japan) interfaced with a universal microscope (Axioskop2 60318, Zeiss, Oberkochen, Germany) and a personal computer (TMR for Windows 2.0.27.2, Inspector Research, Amsterdam, The Netherlands).

2.6. Microhardness assessment

Specimens were cut perpendicularly to the occlusal surface that had been in contact with the restorative materials. Two interfaces were obtained from each specimen and these were embedded in epoxy resin with the transverse cut face exposed. The surface was serially polished to a 1 μm finish. The Vickers hardness number (VHN) was calculated from ten diamond indents that were made at 50 μm below the anatomical occlusal surface of each specimen. A Vickers hardness tester (HMV, Shimadzu, Kyoto, Japan) was used with a load of 1 N (100 g) applied for 15 s.

2.7. Fluorescence and confocal microscopy

Three exemplary dentin specimens from the microhardness evaluation were employed for both optical fluorescence and confocal microscopy to ascertain the interfacial characteristics of the demineralized /remineralized dentin interfaces. The specimens were immersed in 1 wt% aqueous fluorescein dye solution for 24 h and subsequently rinsed in an ultrasonic bath for 2 min containing distilled water. The specimens were polished using 1200-grit SiC paper for 30 s followed by a further rinse in an ultrasonic bath (2 min). Baseline lesions were similarly prepared.

The specimens were first evaluated in a fluorescence optical microscope (DEM2500 LED) equipped with a LED light and a filter-pass (490–520 nm) and a $20\times$ NA 0.7 oil-immersion lens. Subsequently, the specimens were examined using a confocal laser scanning microscope (Leica SP5 CLSM; Leica, Heidelberg, Germany), equipped with a $63\times/1.4$ NA oil-immersion lens and a 514 nm argon/helium ion laser. Confocal laser scanning microscopy reflection and fluorescence images were obtained with a 1- μm z-step to optically section the specimens to a depth of up to 20 μm below the surface. The z-axis scan of the interface surface was compiled into a single projection using the Leica SP5 CLSM image-processing software (Leica). The configuration of the system was standardized and used at the same settings for the entire investigation. Each dentin interface was completely investigated and five micrographs representing the most common morphology features observed in the specimens were captured and recorded.

2.8. Transmission electron microscopy

Further three representative specimens from each group previously tested for microhardness were used for TEM. Specimens were fixed in Karnovsky's fixative, post-fixed with 1% osmium tetroxide, dehydrated in an ascending ethanol series (30–100%), transitioned through propylene oxide and embedded in epoxy resin. Baseline lesions were similarly prepared.

Thick sections (180–200 nm) of the caries-like lesions including the mineralized dentin base were prepared without additional demineralization and examined unstained for evaluating the overall effect of remineralization. Resin blocks were then trimmed for thin section preparation (90 nm). Examination was performed using a JEM-1230 TEM (JEOL, Tokyo, Japan) at 110 kV.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 20 (IBM, Chicago, IL, USA). Data distribution was assessed via Shapiro-Wilk-test. Generalized linear modelling (GLM) was performed to determine differences across groups. Level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

The microradiographic analysis showed that the simulated carious lesion attained in the specimens with the D1 protocol had a median mineral loss ΔZ [25th/75th percentiles] of 3978 [3622/5266] vol% $\times\mu\text{m}$ and microhardness of 37.4 (30.0/45.4) VHN. Those specimens processed with the D2 protocol had 5047 (4859/5569) vol% $\times\mu\text{m}$ and 31.9 (25.0/42.3) VHN, while the specimens in group D3 had 6649 (5991/8155) vol% $\times\mu\text{m}$ and 35.7 (25.9/43.6) VHN.

After the remineralization period, it was observed that all four restorative materials induced mineral gain without any significant difference between the groups ($p > 0.05$). However, differences in mineral gain were detected between lesion types; significantly higher values were observed in deep bacterially-induced lesions compared to shallow or deep chemically-induced lesions (Fig. 2A).

Microhardness was only selectively increased by the restorative materials. For instance, GIC failed to increase the hardness regardless of the lesion type (Fig. 2B). EXP provided significant hardness gain only in the specimens of group D3. BIO and MTA increased the hardness in all lesions types and these were significantly superior to GIC and EXP ($p < 0.05$).

The fluorescence and confocal microscopy confirmed the results obtained during microradiography and microhardness measurements. The demineralization process performed with bacteria (D3) created a deeply demineralized and denatured dentin, resembling natural residual lesions (Fig. 3A). The demineralization protocol D1 created only shallow lesions, which showed limited fluorescein uptake. The fluorescein uptake into the demineralized dentin created with D2 was deeper, while denaturation was not detected (Fig. 3B,C). None of the treatments had completely remineralized the lesions. However, D3-lesions showed detectable mineral precipitation after remineralization using BIO and MTA (Fig. 3D).

Such results were confirmed by TEM analysis, where it was possible to see clear mineral precipitation on the top of the dentin treated with BIO (Fig. 4A) and MTA (Fig. 4B). In these latter specimens, irregularly shaped (needle-like or globular) mineral crystals were often detected. In the case of dentin treated with GIC, there was no evidence of collagen remineralization (Fig. 4C). Specimens restored using EXP showed limited mineral precipitation on the top of the dentin, but localised

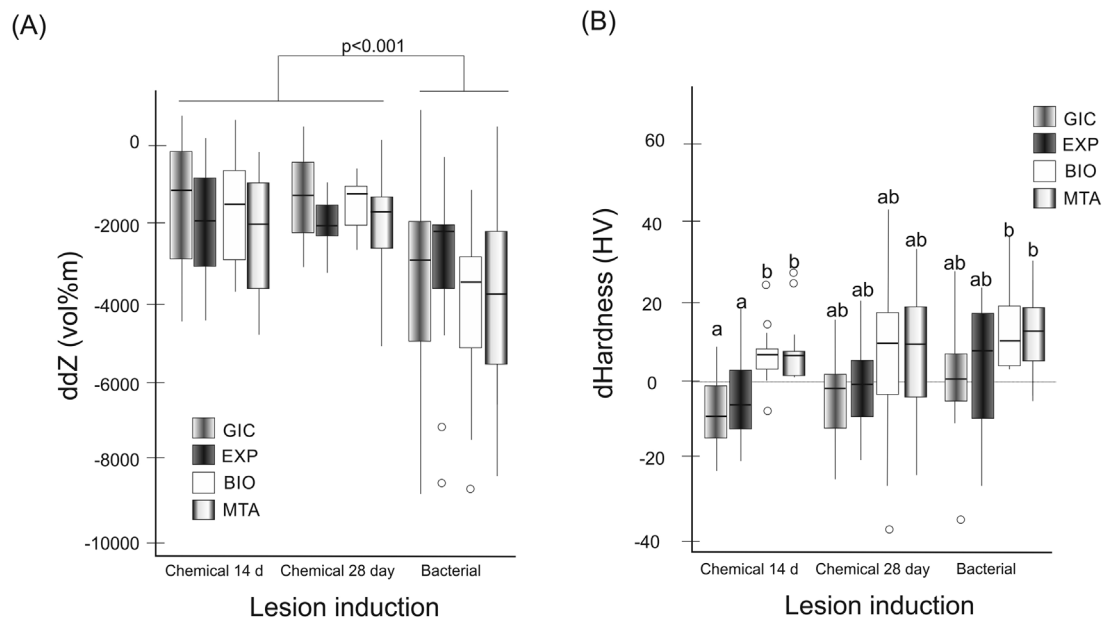


Fig. 2 – Mineral (A) and hardness (B) gains induced by the different materials. Absolute mineral differences (ddZ) and hardness differences (dHV) provided by the glass ionomer cement (GIC), the experimental adhesive system (EXP), Biodentine (BIO) and Mineral Trioxide Aggregate (MTA) compared with baseline are shown. Different lesion types were remineralized (D1: chemical 14 days, D2: chemical 28 days, D3: bacterial). Note that mineral gains are indicated by negative values (the mineral loss was reduced), while hardness gains are indicated by positive values (hardness was increased). Mineral differences were only detected between lesion types; being significantly higher in bacterially induced lesions than chemically induced ones. In contrast, hardness gains differed between materials. Shared superscript letters indicate no significant difference between the groups. Line and box: Median and 25th/75th percentiles, whiskers: min./max. after exclusion of outliers, circles: outliers.

“bottom-up” intrafibrillar collagen remineralization in D1- and D2-lesions, with the collagen morphology resembling that of sound dentin (Fig. 4D).

4. Discussion

Our results warrant partial rejection of the null hypothesis that the remineralization (mineral and hardness gain, assessed through transverse microradiography and microhardness) would not differ significantly between the tested materials.

Different increases in mineral content were detected between the three simulated lesion types (D1, D2 and D3). Indeed, higher relative mineral gains were observed in deep bacterially-induced lesions (D3) compared to shallow (D1) or deep chemically-induced ones (D2). Conversely, the increase in microhardness was material-dependent; only BIO and MTA induced a significant increase of hardness in all lesions types of demineralized dentin lesions. However, complete remineralization of the simulated lesions was not achieved with any material.

In details, it was found that both BIO and MTA formed a layer of intermediate, structurally altered remineralized tissue between the cement and the dentin. This is in agreement with the findings reported by Atmeh et al. [24], who showed that Biodentine was able to form a mineral infiltration zone in dentin, just beneath the cement [24]. Formation of such

layer was suggested to be the result of carbonate and/or apatite formation within the superficial dentin tubules [25,26]. However, our TEM results revealed that such a mineral precipitation achieved both with BIO and MTA was characterized by the absence of collagen fibrils. It is well known that calcium silicate cements form calcium hydroxide, which is a highly alkaline material ($\text{pH} = 13$), and hence may cause caustic degradation of exposed demineralized collagen (as is found in carious dentin). This effect is mediated by the breakdown of intermolecular bonds in the collagen fibrils, increasing their water absorption and leading to swelling [27] as well as changing collagen conformation [24]. Thus, calcium silicate cements may deliver a great deal of mineral to the demineralized dentin, thereby increasing its hardness, but with no possibility to achieve intrafibrillar remineralization and recovery of a sound module of elasticity [28].

In our study, GIC provided mineral, but not hardness gains to demineralized dentin. Hence, while artificial carious dentin can be “remineralized” using GIC [29], even to significant depths [14], the formation of carbonated apatite inside and around collagen fibrils in demineralized dentin cannot be expected.

Our results demonstrate that the use of the experimental adhesive containing fluoride-doped bioglass (EXP) provided mineral and microhardness gains, especially in the lesion attained using the bacteria-mediated demineralization protocol. The bioglass used in EXP had been utilized in a previous study, where it was able to alkalinize the incubation media,

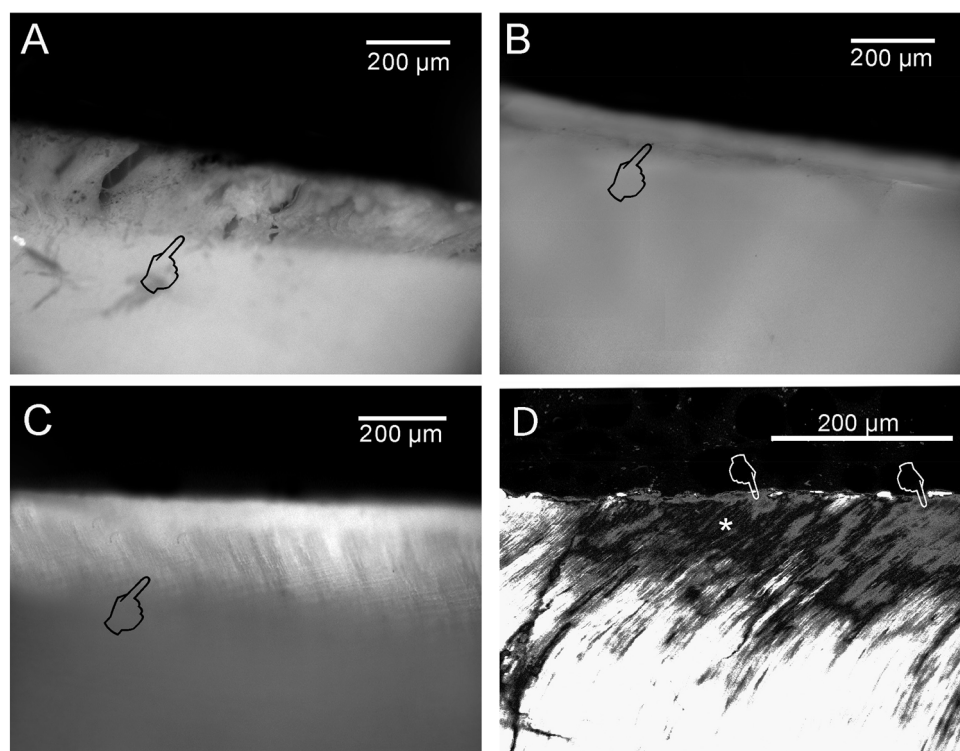


Fig. 3 – Fluorescence and confocal microscopic images of remineralized dentin specimens. (A) The fluorescence microscopy showed that the demineralization process performed in dentin with bacteria (D3) was able to create a layer of deeply demineralized and denatured dentin (Pointer). **(B)** The chemical demineralization process D1 was able to demineralise the dentin without creating any denaturation (Fig. 2b). However, this demineralized layer was not as deep (pointer) as the one observed in the specimens chemically demineralized using the process D2. **(C)** In this confocal image it is possible to see that the demineralization area (pointer: fluorescein uptake from the demineralized dentin collagen) is deeper than 200 µm. **(D)** The only materials to show evident mineral precipitation in demineralized dentin (pointers) during confocal microscopy evaluation were MTA (shown here in a D3-lesion) and BIO. Nevertheless, large areas of the dentin remain demineralized (*).

reduce the solubilization of dentin collagen telopeptides, and significantly increase the stiffness of the demineralized dentin matrices [20]. It has been advocated that bioactive glasses can release Si(OH)_4 , which then binds to demineralized collagen and polymerizes into an absorbent SiO_2 -rich layer. This layer might assist in the precipitation of amorphous calcium phosphate [30], and subsequent conversion into nonstoichiometric apatite [31]. Moreover, an alkaline environment rich in minerals may allow Si(OH)_4 condensation and Ca^{2+} and PO_4^{3-} precipitation; this may help to fossilize metalloproteinases and cathepsins and reduce their proteolytic activity [32]. This may explain why collagen was preserved in the specimens tested in this study (Fig. 4D). In contrast, the two calcium silicate cements (BIO and MTA) may have replaced collagen by minerals via caustic degradation, as previously described.

Our TEM results confirmed that it was possible to obtain an intrafibrillar “bottom-up” remineralization of the collagen fibrils via EXP in some, but not all zones of the demineralized dentin. We believe that this was possible due to the presence of two biomimetic analogues of remineralization in the experimental primer. The application of such biomimetic analogues has been found to promote hierarchical intrafibrillar deposition of needle-like crystallites, hence stabilizing bond strengths and reducing nanoleakage [33]. Furthermore, such

biomimetic remineralization allows to slowly “back-fill” residual water trees in the hybrid layer with apatite crystallites via pre-nucleation clusters to produce fluidic, polymer-stabilised amorphous calcium phosphate nano-precursors [30,34].

This study has a number of limitations. First, we used – albeit different – artificial lesions in this study, for reasons of availability and standardization. Future studies should assess if our findings are applicable to genuine dentin carious lesions. These lesions should be more difficult to remineralize due to their variability in lesion depths and degrees of tubular occlusion [15,35]. Moreover, unlike artificial caries-like lesions, demineralization in real human caries-affected dentin is often manifested as sporadic islands of demineralization instead of a continuous demineralization gradient from the lesion surface to the lesion base [36]. Second, only representative commercial and experimental materials have been used; a wide range of calcium silicates is available and could have been tested [37]. Third, we only assessed mineral and microhardness gains, and further studied ultrastructural effects. Material effects on the pulp or on bacteria within contaminated carious lesions have not been tested here [19]. Finally, the clinical relevance of our findings remains unclear; for instance, the impact of remineralization on restoration longevity cannot be directly inferred.

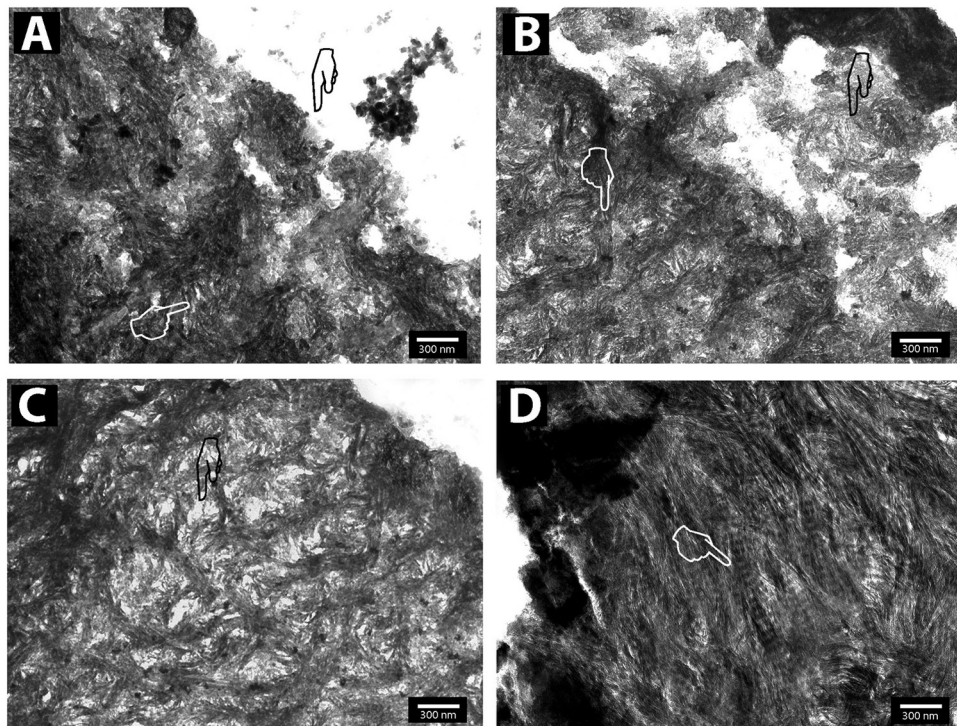


Fig. 4 – TEM assessment of remineralized lesions. (A) Representative TEM image of a dentin mineralized using BIO. A clear mineral precipitation is detectable on the top of the dentin (black pointer), and minerals with different shapes (needle-like or globular) and dimension (white pointer) are present within the demineralized dentin. **(B)** The same situation was observed with dentin mineralized using MTA. Evident mineral precipitation is detectable on the top of the dentin (black pointer), and minerals with different shapes and dimension (white pointer) can be seen within the demineralized dentin. **(C)** Dentin specimen treated with GIC. In this case there was no evidence of collagen remineralization (black pointer). **(D)** Dentin treated using EXP showed in a several cases intrafibrillar remineralization (white pointer) in all three types of lesions, with the collagen morphology resembling that of sound dentin.

5. Conclusions

Within the limitation of this study, we affirmed that complete remineralization of carious lesions remain a challenge. However, Biodentine and MTA may provide effective mineral precipitation and microhardness recovery in different artificial carious lesions. Nevertheless, experimental adhesives, containing ions-releasing fluoride-doped bioglass and biomimetic analogues of remineralization, may be able to allow intra-fibrillar collagen mineral infiltration.

REFERENCES

- [1] Schwendicke F, Frencken JE, Bjørndal L, Maltz M, Manton DJ, Ricketts D, et al. Managing carious lesions: consensus recommendations on carious tissue removal. *Adv Dent Res* 2016;28:58–67.
- [2] Yoshiyama M, Doi J, Nishitani Y, Itota T, Tay FR, Carvalho RM, et al. Bonding ability of adhesive resins to caries-affected and caries-infected dentin. *J Appl Oral Sci* 2004;12: 171–6.
- [3] Yoshiyama M, Tay FR, Doi J, Nishitani Y, Yamada T, Itou K, et al. Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. *J Dent Res* 2002;81:556–60.
- [4] Miyauchi H, Iwaku M, Fusayama T. Physiological recalcification of carious dentin. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 1978;25:169–79.
- [5] Corralo DJ, Maltz M. Clinical and ultrastructural effects of different liners/restorative materials on deep carious dentin: a randomized clinical trial. *Caries Res* 2013;47:243–50.
- [6] Marchi JJ, Froner AM, Alves HL, Bergmann CP, Araujo FB. Analysis of primary tooth dentin after indirect pulp capping. *J Dent Child (Chic)* 2008;75:295–300.
- [7] Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani. Ion uptake into demineralized dentine from glass ionomer cement following pretreatment with silver fluoride and potassium iodide. *Aust Dent J* 2006;51:237–41.
- [8] Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani, Zilm PS, Gully NJ. An in vitro investigation of marginal dentine caries abutting composite resin and glass ionomer cement restorations. *Aust Dent J* 2007;52:187–92.
- [9] Creanor SL, Awawdeh LA, Saunders WP, Foye RH, Gilmour WH. The effect of a resin-modified glass ionomer restorative material on artificially demineralised dentine caries in vitro. *J Dent* 1998;26:527–31.
- [10] Yang B, Flaim G, Dickens SH. Remineralization of human natural caries and artificial caries-like lesions with an experimental whisker-reinforced ART composite. *Acta Biomater* 2011;7:2303–9.
- [11] Ngo HC, Mount G, McIntyre J, Tuisuva J, Von Doussa RJ. Chemical exchange between glass-ionomer restorations and residual carious dentine in permanent molars: an in vivo study. *J Dent* 2006;34:608–13.

- [12] Mukai M, Ikeda M, Yanagihara T, Hara G, Kato K, Nakagaki H, et al. Fluoride uptake in human dentine from glass-ionomer cement in vivo. *Arch Oral Biol* 1993;38:1093–8.
- [13] Smales RJ, Ngo HC, Yip KH, Yu C. Clinical effects of glass ionomer restorations on residual carious dentin in primary molars. *Am J Dent* 2005;18:188–93.
- [14] Al-Abdi A, Paris S, Schwendicke F. Glass hybrid, but not calcium hydroxide, remineralized artificial residual caries lesions in vitro. *Clin Oral Investig* 2017;21:389–96.
- [15] Schwendicke F, Eggers K, Meyer-Lueckel H, Dörfer C, Kovalev A, Gorb S, et al. In vitro induction of residual caries lesions in dentin: comparative mineral loss and nano-hardness analysis. *Caries Res* 2015;49:259–65.
- [16] Buskes JA, Christoffersen J, Arends J. Lesion formation and lesion remineralization in enamel under constant composition conditions. A new technique with applications. *Caries Res* 1985;19:490–6.
- [17] Umwali A, Askar H, Paris S, Schwendicke F. Radiographic, antibacterial and bond-strength effects of radiopaque caries tagging. *Sci Rep* 2016;6:27319.
- [18] Schwendicke F, Dorfer C, Kneist S, Meyer-Lueckel H, Paris S. Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a dental biofilm model. *Caries Res* 2014;48:186–92.
- [19] Marggraf T, Ganas P, Paris S, Schwendicke F. Bacterial reduction in sealed lesions depends on initial bacterial loads, sealing periods and restorative treatment in vitro. *Sci Rep* 2018;8:3767.
- [20] Tezvergöl-Mutluay A, Seseogullari-Dirihan R, Feitosa VP, Cama G, Brauer DS, Sauro S. Effects of composites containing bioactive glasses on demineralized dentin. *J Dent Res* 2017;96:999–1005.
- [21] Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996;7:104–33.
- [22] Wong L, Sissons CH. A comparison of human dental plaque microcosm biofilms grown in an undefined medium and a chemically defined artificial saliva. *Arch Oral Biol* 2001;46:477–86.
- [23] Ciucchi B, Bouillaguet S, Holz J, Pashley D. Dentinal fluid dynamics in human teeth, in vivo. *J Endod* 1995;21:191–4.
- [24] Atmeh AR, Chong EZ, Richard G, Festy F, Watson TF. Dentin-cement interfacial interaction: calcium silicates and polyalkenoates. *J Dent Res* 2012;91:454–9.
- [25] Han L, Okiji T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. *Int Endod J* 2011;44:1081–7.
- [26] Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT. The biom mineralization ability of mineral trioxide aggregate and Portland cement on dentin enhances the push-out strength. *J Endod* 2010;36:286–91.
- [27] Kemp GD, Tristram GR. The preparation of an alkali-soluble collagen from demineralized bone. *Biochem J* 1971;124:915–9.
- [28] Kim YK, Yiu CK, Kim JR, Gu L, Kim SK, Weller RN, et al. Failure of a glass ionomer to remineralize apatite-depleted dentin. *J Dent Res* 2010;89:230–5.
- [29] Kawasaki K, Ruben J, Stokroos I, Takagi O, Arends J. The remineralization of EDTA-treated human dentine. *Caries Res* 1999;33:275–80.
- [30] Sauro S, Pashley DH. Strategies to stabilise dentine-bonded interfaces through remineralising operative approaches — state of the art. *Int J Adhes Adhes* 2016;69:39–57.
- [31] Hoppe A, Guldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 2011;32:2757–74.
- [32] Tjaderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldini S, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater* 2013;29:116–35.
- [33] Abuna G, Feitosa VP, Correr AB, Cama G, Giannini M, Sinforeti MA, et al. Bonding performance of experimental bioactive/biomimetic self-etch adhesives doped with calcium-phosphate fillers and biomimetic analogs of phosphoproteins. *J Dent* 2016;52:79–86.
- [34] Gu LS, Kim J, Kim YK, Liu Y, Dickens SH, Pashley DH, et al. A chemical phosphorylation-inspired design for Type I collagen biomimetic remineralization. *Dent Mater* 2010;26:1077–89.
- [35] Pugach MK, Strother J, Darling CL, Fried D, Gansky SA, Marshall SJ, et al. Dentin caries zones: mineral, structure, and properties. *J Dent Res* 2009;88:71–6.
- [36] Silva NR, Carvalho RM, Pegoraro LF, Tay FR, Thompson VP. Evaluation of a self-limiting concept in dentinal caries removal. *J Dent Res* 2006;85:282–6.
- [37] Emara R, Elhennawy K, Schwendicke F. Effects of calcium silicate cements on dental pulp cells: a systematic review. *J Dent* 2018;77:18–36.

10.2 Anexo 2.

D. José María Montiel Company, Profesor Contratado Doctor Interino del departamento de Estomatología, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada el día 13 de septiembre de 2018, una vez estudiado el proyecto de tesis doctoral titulado:
"Remineralización biomimética de la dentina afectada mediante adhesivos bioactivos", número de procedimiento H1537947515352,
cuyo responsable es D. Álvaro Ferrando Cascales, dirigido por D. Agustín Pascual Moscardó,
ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a veintiseis de septiembre de dos mil dieciocho.



10.3 Anexo 3.



EFFECTS OF AN ADHESIVE CONTAINING FLUORIDE-DOPED BIOGLASS ON CARIES-AFFECTED DENTINE

Álvaro Ferrando¹, Agustín Pascual², Salvatore Sauro³

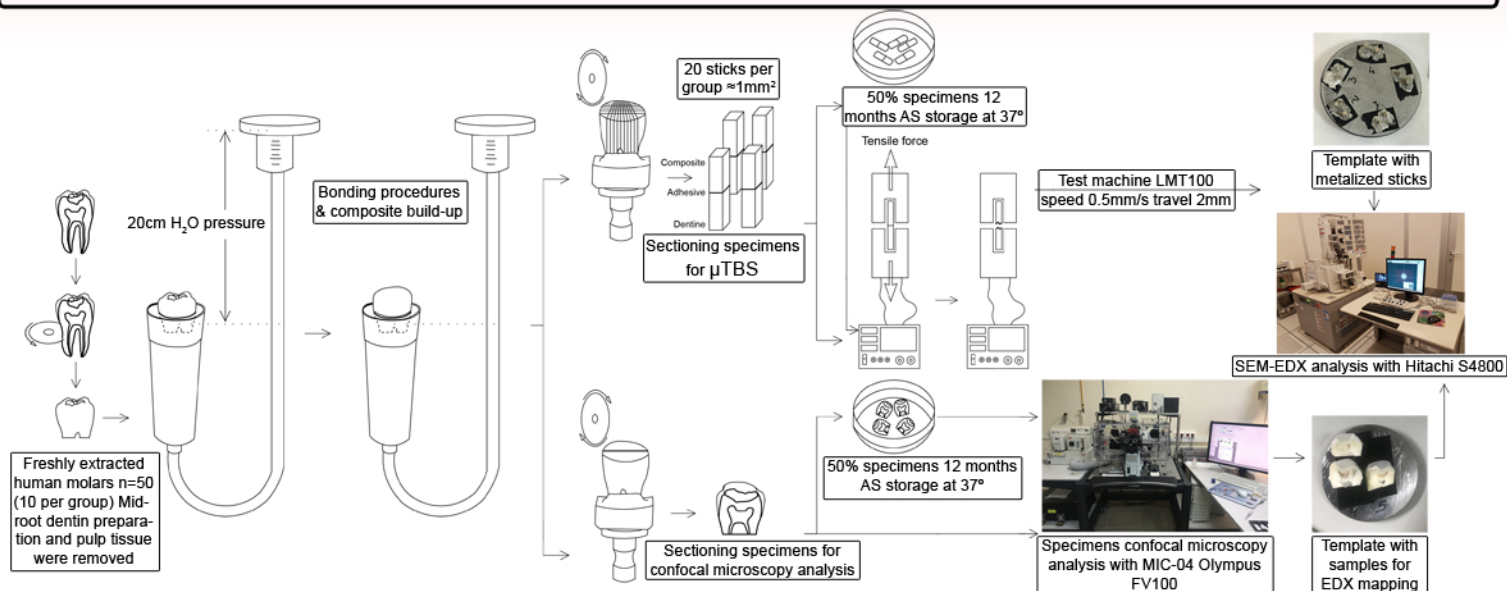
¹Phd Student. Stomatology, University of Valencia, Valencia, Spain. ²Full Professor. Stomatology, University of Valencia, Valencia, Spain. ³Full Professor. Dental Biomaterials, Preventive & Minimally Invasive Dentistry, CEU Cardenal Herrera University, Alfara del Patriarca, Valencia, Spain

OBJECTIVES

This in vitro study aimed at evaluating the effects of an experimental adhesive system containing fluoride-doped bioglass, applied on caries-affected dentine (CAD) in self-etching (SE) or etch&rinse (ER) mode.

METHODS

50 Human molars with deep caries lesions were collected and subsequently prepared by means of selective caries excavation using CARISOLV™. The teeth were divided in groups based on the materials tested in this study and on their mode of application: RMGIC (RIVAL LC, SDI); OPT (three-step adhesive, Optibond FL, Kerr); UA (Prime&Bond Active, Dentsply) applied in SE mode (UA-SE); EXP-SE (Experimental adhesive applied in SE mode) and in ER mode (EXP-ER). EXP consisted in a primer containing remineralisation biomimetic analogues and a bond with 40 wt% fluoride-doped bioglass. UA-SE, RMGIC and OPT were applied and light-cured as per manufacturer's instructions, while EXP was applied in ER and SE and light-cured for 30s. Bulk-fill composite build up (SDR, Dentsply) was performed in 4mm-layers after adhesive application under simulated pulpal pressure (20cm H₂O). The specimens were cut in match-sticks (1mm²), half of them were stored for 24h and half for 12 months in artificial saliva (AS). They were submitted to μ TBS, SEM-EDX mapping. Two exemplary dentin specimens of each group were employed for confocal microscopy evaluation, the other two were stored 12 months in artificial saliva (AS).



RESULTS

OPT and UA exhibited the highest bond strength at 24h, while after 1 year, EXP SE was the only adhesive to show no significant reduction in bond strength ($p < 0.05$). SEM confirmed the protection of dentinal collagen at 12 months in the case of RMGIC and the two EXP groups against OPT and UA-SE where exposure and collagen degradation was observed. The mineralization [EDX: Phosphorous concentration ($p < 0.05$)] was clearly increased in those specimens treated with the EXP material. Confocal microscopy supported such outcomes showing obvious mineral precipitation at the resin-dentine interface.

μ TBS-STATISTIC ANALYSIS

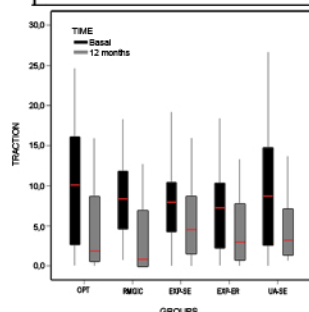


Table 1. μ TBS

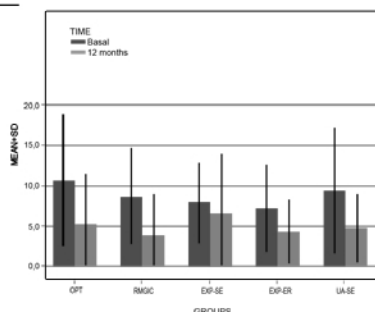


Table 2. μ TBS per group and time

	Mpa	%
OPT	-5,32 ± 2,25	-50,4
RMGIC	-4,76 ± 2,54	-54,6
EXP-SE	-1,26 ± 2,29	-15,9
EXP-ER	-2,94 ± 1,47	-40,8
UA-SE	-4,56 ± 1,89	-48,6

Table 3. Loss of adhesive resistance (T1-T0) mean absolute difference \pm standard error (MPa) and relative (%)

	p-value
Grupo	0,583
Tiempo	<0,001***
Grupo x tiempo	0,661

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Table 4. Resistance according to group and time: Ftest results of the general 2-way ANOVA lineal model

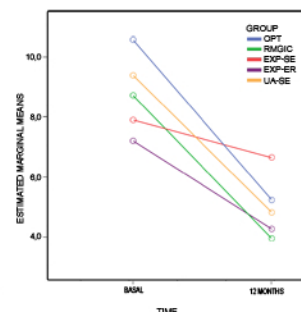
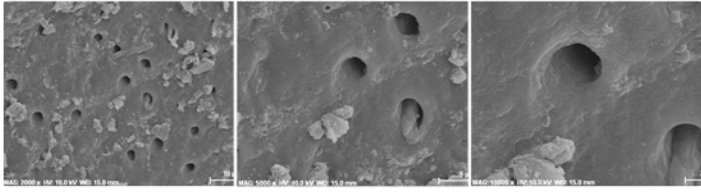


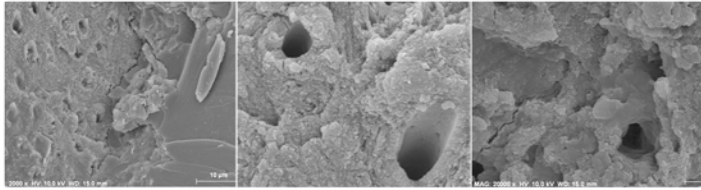
Table 5. μ TBS estimated marginal means

SEM ANALYSIS 12 MONTHS AGED

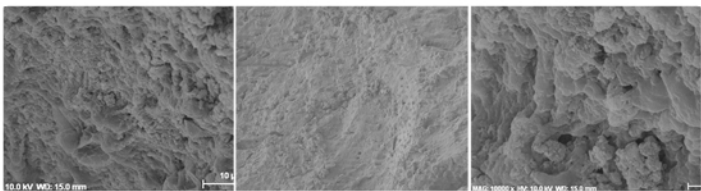
OPT: typical mixed failure with exposed caries dentine that fractured during tensile test.



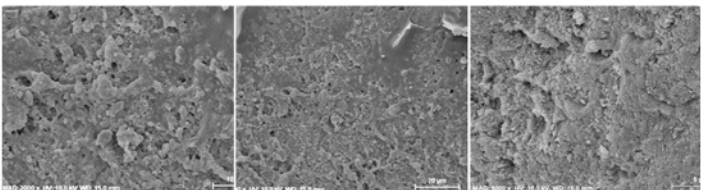
UA-SE: no collagen fibrils because they were probably degraded and the fracture occurred within the caries dentine.



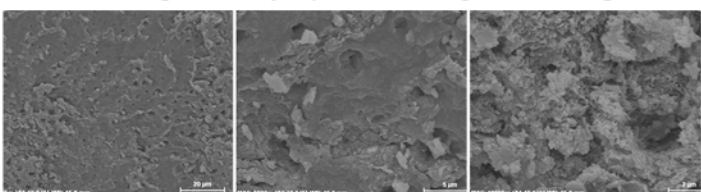
RMGIC: the dentine was always covered by residual material. Collagen is rarely exposed even after prolonged storage.



EXP-ER: dentine was always covered by mineral and adhesive and collagen was rarely exposed after long time of storage.



EXP-SE: dentine was almost always covered by mineral and adhesive and collagen is rarely exposed after long time of storage.



CONCLUSION

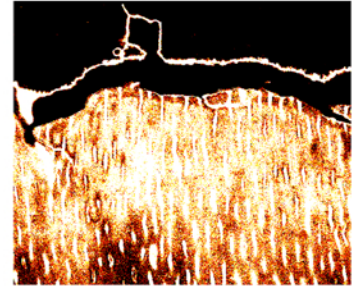
After selective caries removal, conventional simplified adhesive or classic adhesive approach (E&R) may not be the most appropriate choice to achieve long-lasting bonding performance. Instead, GIC/RMGIC and innovative self-etching ion-releasing materials may be necessary to attain a stable bonding and a therapeutic bioactive/biomimetic remineralization of caries affected dentine.



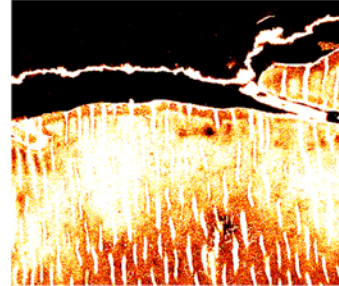
CEU
Universidad
Cardenal Herrera

CONFOCAL MICROSCOPY ANALYSIS 12 MONTHS AGED

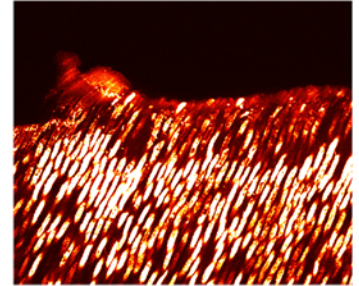
OPT: interface with no remineralisation.



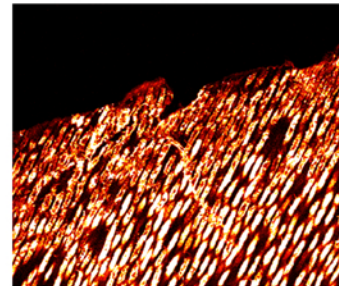
UA-SE: no remineralisation.



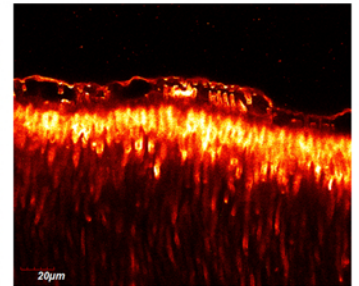
RMGIC: remineralised dentine.



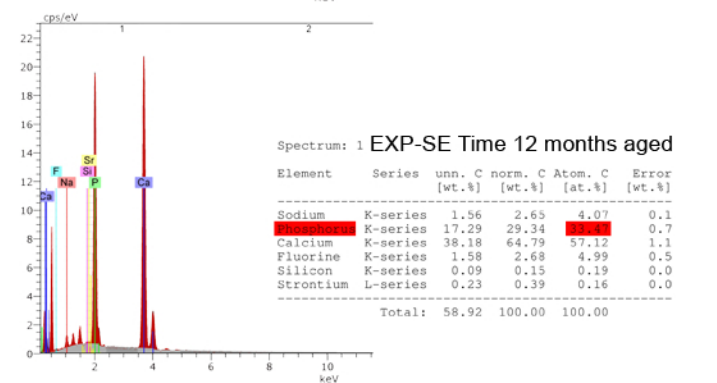
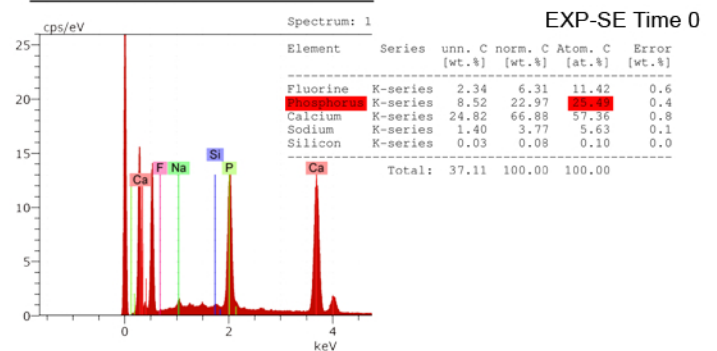
EXP-ER: remineralised dentine.



EXP-SE: remineralised dentine.



SEM-EDX MAPPING ANALYSIS



10.4 Anexo 4.

T1.- TOTAL DE MUESTRAS: GRUPO Y TIEMPO

	TIEMPO					
	Total		Basal		1 año	
	N	%	N	%	N	%
Total	213	100,0%	111	52,1%	102	47,9%
OPT	42	19,7%	20	9,4%	22	10,3%
RMGIC	40	18,8%	20	9,4%	20	9,4%
EXP-SE	40	18,8%	20	9,4%	20	9,4%
EXP-TE	42	19,7%	22	10,3%	20	9,4%
UA	49	23,0%	29	13,6%	20	9,4%

T2.- PRE-ROTURAS según GRUPO Y TIEMPO

			TIEMPO					
			Total		Basal		1 año	
			N	%	N	%	N	%
Total	PREROTURA	Total	213	100,0%	111	100,0%	102	100,0%
		No	182	85,4%	94	84,7%	88	86,3%
		Sí	31	14,6%	17	15,3%	14	13,7%
OPT	PREROTURA	Total	42	100,0%	20	100,0%	22	100,0%
		No	41	97,6%	19	95,0%	22	100,0%
		Sí	1	2,4%	1	5,0%	0	,0%
RMGIC	PREROTURA	Total	40	100,0%	20	100,0%	20	100,0%
		No	19	47,5%	10	50,0%	9	45,0%
		Sí	21	52,5%	10	50,0%	11	55,0%
EXP-SE	PREROTURA	Total	40	100,0%	20	100,0%	20	100,0%
		No	31	77,5%	14	70,0%	17	85,0%
		Sí	9	22,5%	6	30,0%	3	15,0%
EXP-TE	PREROTURA	Total	42	100,0%	22	100,0%	20	100,0%
		No	42	100,0%	22	100,0%	20	100,0%
		Sí	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
UA-SE	PREROTURA	Total	49	100,0%	29	100,0%	20	100,0%
		No	49	100,0%	29	100,0%	20	100,0%
		Sí	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

T3.- MUESTRAS VÁLIDAS: GRUPO Y TIEMPO

	TIEMPO					
	Total		Basal		1 año	
	N	%	N	%	N	%
Total	182	100,0%	94	51,6%	88	48,4%
OPT	41	22,5%	19	10,4%	22	12,1%
RMGIC	19	10,4%	10	5,5%	9	4,9%
EXP-SE	31	17,0%	14	7,7%	17	9,3%
EXP-ER	42	23,1%	22	12,1%	20	11,0%
UA-SE	49	26,9%	29	15,9%	20	11,0%

T4.- FUERZA TRACCIÓN (Mpa) según GRUPO Y TIEMPO

		GRUPO								
		Total			OPT			RMGIC		
		TIEMPO			TIEMPO			TIEMPO		
		Total	Basal	1 año	Total	Basal	1 año	Total	Basal	1 año
TRACCION	N	182	94	88	41	19	22	19	10	9
	Media	7,00	8,81	5,06	7,70	10,55	5,23	6,46	8,71	3,95
	Desviación típica	6,41	6,71	5,48	7,60	8,08	6,35	5,91	5,91	5,07
	Mínimo	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,70	,00
	Máximo	27,50	26,60	27,50	24,60	24,60	23,40	18,30	18,30	12,70
	Mediana	6,05	8,22	3,00	4,77	10,09	1,80	5,40	8,35	,84

		GRUPO								
		EXP-SE			EXP-ER			UA-SE		
		TIEMPO			TIEMPO			TIEMPO		
		Total	Basal	1 año	Total	Basal	1 año	Total	Basal	1 año
TRACCION	N	31	14	17	42	22	20	49	29	20
	Media	7,21	7,90	6,64	5,80	7,20	4,26	7,52	9,38	4,82
	Desviación típica	6,28	4,88	7,34	4,92	5,37	3,96	6,82	7,66	4,22
	Mínimo	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,59
	Máximo	27,50	19,20	27,50	18,40	18,40	13,30	26,60	26,60	13,68
	Mediana	7,80	8,00	4,50	5,50	7,21	3,00	6,09	8,73	3,22

T5.- TIPO DE FRACTURA según GRUPO Y TIEMPO

		GRUPO											
		Total						OPT					
		TIEMPO						TIEMPO					
		Total		Basal		1 año		Total		Basal		1 año	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Total		182	100,0%	94	100,0%	88	100,0%	41	100,0%	19	100,0%	22	100,0%
Adhesiva		81	44,5%	43	45,7%	38	43,2%	19	46,3%	8	42,1%	11	50,0%
Cohesiva resina		21	11,5%	12	12,8%	9	10,2%	4	9,8%	4	21,1%	0	,0%
Cohesiva dentina		1	,5%	0	,0%	1	1,1%	1	2,4%	0	,0%	1	4,5%
Mixta		77	42,3%	38	40,4%	39	44,3%	16	39,0%	7	36,8%	9	40,9%
No clasificable		2	1,1%	1	1,1%	1	1,1%	1	2,4%	0	,0%	1	4,5%

	GRUPO											
	RMGIC						EXP-SE					
	TIEMPO						TIEMPO					
	Total		Basal		1 año		Total		Basal		1 año	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Total	19	100,0%	10	100,0%	9	100,0%	31	100,0%	14	100,0%	17	100,0%
Adhesiva	4	21,1%	2	20,0%	2	22,2%	21	67,7%	9	64,3%	12	70,6%
Cohesiva resina	6	31,6%	2	20,0%	4	44,4%	1	3,2%	1	7,1%	0	,0%
Cohesiva dentina	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%
Mixta	9	47,4%	6	60,0%	3	33,3%	9	29,0%	4	28,6%	5	29,4%
No clasificable	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%

	GRUPO											
	EXP-ER						UA-SE					
	TIEMPO						TIEMPO					
	Total		Basal		1año		Total		Basal		1 año	
	N	%	N	%	N	%	%	N	%	N	%	N
Total	42	100,0%	22	100,0%	20	100,0%	49	100,0%	29	100,0%	20	100,0%
Adhesiva	17	40,5%	13	59,1%	4	20,0%	20	40,8%	11	37,9%	9	45,0%
Cohesiva resina	5	11,9%	1	4,5%	4	20,0%	5	10,2%	4	13,8%	1	5,0%
Cohesiva dentina	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%
Mixta	19	45,2%	7	31,8%	12	60,0%	24	49,0%	14	48,3%	10	50,0%
No clasificable	1	2,4%	1	4,5%	0	,0%	0	,0%	0	,0%	0	,0%

T6.- MUESTRAS VÁLIDAS PARA ESTUDIO DE REMINERALIZACIÓN: GRUPO Y TIEMPO

	TIEMPO					
	Total		Basal		1 año	
	N	%	N	%	N	%
Total	30	100,0%	15	50,0%	15	50,0%
OPT	6	20,0%	3	10,0%	3	10,0%
RMGIC	6	20,0%	3	10,0%	3	10,0%
EXP-SE	6	20,0%	3	10,0%	3	10,0%
EXP-ER	6	20,0%	3	10,0%	3	10,0%
UA-SE	6	20,0%	3	10,0%	3	10,0%

T7.- CONCENTRACIÓN MINERALES (%) según GRUPO Y TIEMPO

		GRUPO								
		Total			OPT			RMGIC		
		TIEMPO			TIEMPO			TIEMPO		
		Total	Basal	1 año	Total	Basal	1 año	Total	Basal	1 año
P	N	30	15	15	6	3	3	6	3	3
	Media	31,01	30,72	31,29	31,22	31,49	30,95	30,89	31,73	30,04
	Desviación típica	2,15	2,48	1,79	2,63	3,45	2,28	1,10	,68	,63
	Mínimo	25,49	25,49	29,46	27,51	27,51	29,46	29,62	31,05	29,62
	Máximo	34,76	33,59	34,76	33,59	33,59	33,58	32,41	32,41	30,77
	Mediana	31,25	31,74	30,59	31,59	33,36	29,82	30,91	31,74	29,74
CA	N	30	15	15	6	3	3	6	3	3
	Media	54,75	53,52	55,98	56,14	56,64	55,65	50,01	49,98	50,03
	Desviación típica	5,15	5,75	4,31	3,52	4,05	3,72	2,18	3,36	,76
	Mínimo	44,59	44,59	49,59	51,35	53,14	51,35	46,64	46,64	49,59
	Máximo	63,04	62,59	63,04	61,07	61,07	57,95	53,36	53,36	50,91
	Mediana	55,70	53,14	56,66	56,67	55,70	57,64	49,77	49,94	49,59
F	N	30	15	15	6	3	3	6	3	3
	Media	7,70	9,21	6,20	5,73	6,26	5,20	11,80	13,07	10,54
	Desviación típica	3,69	3,97	2,73	,96	1,03	,62	2,33	2,86	,80
	Mínimo	2,28	3,98	2,28	4,51	5,60	4,51	10,00	10,47	10,00
	Máximo	16,13	16,13	11,46	7,45	7,45	5,70	16,13	16,13	11,46
	Mediana	6,19	10,47	5,70	5,65	5,73	5,39	10,97	12,60	10,15
NA	N	30	15	15	6	3	3	6	3	3
	Media	4,89	5,47	4,31	3,92	4,08	3,76	4,17	3,70	4,64
	Desviación típica	2,30	3,16	,50	,73	1,06	,36	,77	,85	,34
	Mínimo	2,78	2,78	3,38	2,99	2,99	3,38	2,84	2,84	4,34
	Máximo	14,94	14,94	5,14	5,10	5,10	4,10	5,00	4,54	5,00
	Mediana	4,36	4,54	4,34	3,96	4,14	3,81	4,44	3,72	4,57
SI	N	30	15	15	6	3	3	6	3	3
	Media	,66	1,08	,24	,77	1,54	,00	,87	1,52	,21
	Desviación típica	,73	,71	,48	1,06	1,00	,00	,82	,54	,30
	Mínimo	,00	,10	,00	,00	,95	,00	,00	,93	,00
	Máximo	2,70	2,70	1,88	2,70	2,70	,00	1,99	1,99	,56
	Mediana	,38	,97	,08	,48	,97	,00	,75	1,64	,08
SR	N	30	15	15	6	3	3	6	3	3
	Media	,99	,00	1,99	2,22	,00	4,43	2,27	,00	4,54
	Desviación típica	1,81	,00	2,16	2,47	,00	,73	2,51	,00	,55
	Mínimo	,00	,00	,00	,00	,00	3,90	,00	,00	3,91
	Máximo	5,27	,00	5,27	5,27	,00	5,27	4,92	,00	4,92
	Mediana	,00	,00	,66	1,95	,00	4,13	1,96	,00	4,78

		GRUPO								
		EXP-SE			EXP-ER			UA-SE		
		TIEMPO			TIEMPO			TIEMPO		
		Total	Basal	1 año	Total	Basal	1 año	Total	Basal	1 año
P	N	6	3	3	6	3	3	6	3	3
	Media	30,57	27,91	33,22	31,11	30,39	31,82	31,25	32,10	30,40
	Desviación típica	3,44	2,36	1,67	2,32	2,77	2,08	1,00	,56	,20
	Mínimo	25,49	25,49	31,44	27,20	27,20	29,55	30,20	31,54	30,20
	Máximo	34,76	30,20	34,76	33,65	32,03	33,65	32,66	32,66	30,59
	Mediana	30,82	28,04	33,47	31,99	31,95	32,25	31,07	32,10	30,41
CA	N	6	3	3	6	3	3	6	3	3
	Media	56,49	56,89	56,08	58,73	57,52	59,93	52,37	46,55	58,19
	Desviación típica	4,08	5,94	2,42	3,45	4,15	2,86	7,02	1,96	4,20
	Mínimo	50,73	50,73	53,31	52,90	52,90	56,66	44,59	44,59	55,70
	Máximo	62,59	62,59	57,80	61,92	60,94	61,92	63,04	48,51	63,04
	Mediana	57,24	57,36	57,12	59,83	58,71	61,22	52,11	46,55	55,83
F	N	6	3	3	6	3	3	6	3	3
	Media	7,55	9,32	5,79	4,06	4,50	3,62	9,37	12,90	5,84
	Desviación típica	2,71	2,93	,69	,95	,56	1,17	4,48	1,84	3,05
	Mínimo	4,99	5,97	4,99	2,28	3,98	2,28	2,47	11,06	2,47
	Máximo	11,42	11,42	6,24	5,10	5,10	4,42	14,74	14,74	8,40
	Mediana	6,19	10,56	6,13	4,29	4,43	4,16	9,73	12,90	6,64
NA	N	6	3	3	6	3	3	6	3	3
	Media	5,01	5,46	4,56	5,74	7,01	4,47	5,62	7,11	4,14
	Desviación típica	1,47	2,11	,54	4,57	6,87	,38	1,78	,98	,54
	Mínimo	3,27	3,27	4,07	2,78	2,78	4,14	3,54	6,13	3,54
	Máximo	7,49	7,49	5,14	14,94	14,94	4,89	8,09	8,09	4,58
	Mediana	4,81	5,63	4,48	4,26	3,32	4,37	5,36	7,11	4,29
SI	N	6	3	3	6	3	3	6	3	3
	Media	,30	,42	,19	,31	,57	,05	1,05	1,35	,76
	Desviación típica	,36	,52	,11	,33	,24	,06	,73	,30	,99
	Mínimo	,08	,10	,08	,00	,35	,00	,00	1,05	,00
	Máximo	1,02	1,02	,30	,83	,83	,12	1,88	1,64	1,88
	Mediana	,16	,13	,19	,24	,53	,03	1,20	1,35	,41
SR	N	6	3	3	6	3	3	6	3	3
	Media	,08	,00	,17	,06	,00	,11	,34	,00	,68
	Desviación típica	,11	,00	,09	,10	,00	,13	,42	,00	,33
	Mínimo	,00	,00	,08	,00	,00	,00	,00	,00	,36
	Máximo	,26	,00	,26	,26	,00	,26	1,01	,00	1,01
	Mediana	,04	,00	,16	,00	,00	,08	,18	,00	,66

T8.- MICRODUREZA según ASPECTO DENTINA

		ASPECTO								
		Total	amarilla	amarilla-marrón	amarilla-negra	marrón	marrón-clara	marrón-oscuro	marrón-gris	negra
MICRODUREZA	N	54	9	1	1	6	9	13	2	13
	Media	46,17	54,97	47,30	55,20	37,73	50,56	48,19	32,90	40,17
	Desviación típica	12,63	5,69	.	.	6,11	9,17	18,36	,14	9,30
	Mínimo	28,00	50,20	47,30	55,20	28,00	43,00	30,70	32,80	34,00
	Máximo	90,00	68,70	47,30	55,20	44,30	68,80	90,00	33,00	64,00
	Mediana	44,40	54,00	47,30	55,20	39,45	45,80	41,20	32,90	35,30

10.5 Anexo 5.

(HNV Microhardness tester SHIMADZU, Parámetros: 50g/0,49Nx15seg, muestras pulidas previamente con disco de granulometría 1.200 durante 10seg)

			Indentaciones				Promedio	Promedio gral
D1 1.1	1.1.1	Interior	64,7	57,2	52,6	43,1	54,40	48,48
		Exterior	51,2	48	32,1	38,9	42,55	
	1.1.2	Interior	48,2	41,9	42,1	40,3	43,13	40,58
		Exterior	42,2	42,7	35,2	32	38,03	
	1.1.3	Interior	47,8	48,6	50,8	51,2	49,60	39,59
		Exterior	30,9	28,8	29,2	29,4	29,58	
	1.1.4	Interior	40,1	38,4	38,1	41,6	39,55	40,89
		Exterior	42	45	41,3	40,6	42,23	
1.1.5	Interior	46,2	44	45	33,5	42,18	40,43	
	Exterior	52,8	41,4	30,1	30,4	38,68		
D1 2.1	2.1.1	Interior	23	22,7	23,7	25	23,60	25,28
		Exterior	28	29,1	26,7	24	26,95	
	2.1.2	Interior	27,9	29,8	29,7	29	29,10	30,59
		Exterior	34,3	32,6	31,4	30	32,08	
	2.1.3	Interior	41,5	34,6	38,7	44	39,70	38,75
		Exterior	39,3	41	31	39,9	37,80	
	2.1.4	Interior	22,3	27,2	35,1	43,2	31,95	29,25
		Exterior	30,7	21,8	23,3	30,4	26,55	
2.1.5	Interior	53,5	59,5	52,8	48,5	53,58	43,79	
	Exterior	42,4	37,3	28,2	28,1	34,00		
D1 3.1	3.1.1	Interior	47,3	42,6	42	36,1	42,00	38,96
		Exterior	46,4	42,6	30,7	24	35,93	
	3.1.2	Interior	53	49,9	42,7	37,4	45,75	43,86
		Exterior	41,8	48	44,6	33,5	41,98	
	3.1.3	Interior	57,1	54,9	52,8	57	55,45	65,74
		Exterior	76	80,3	74,9	72,9	76,03	
	3.1.4	Interior	46,3	44,8	47	42,8	45,22	47,56
		Exterior	50,6	56,9	44,5	47,6	49,90	
3.1.5	Interior	50,7	47,1	40,6	38,6	44,25	39,58	
	Exterior	34	36	33,1	36,5	34,90		
	4.1.1	Interior	19,3	30,9	33,4	40,7	31,08	25,66
		Exterior	17,1	20,1	21,9	21,9	20,25	
	4.1.2	Interior	44	42,9	42,8	42,1	42,95	39,09
		Exterior	40,7	34,3	32,2	33,7	35,23	

D1 4.1	4.1.3	Interior	42,2	44	42,4	42,6	42,80	42,71
		Exterior	42,5	46,5	46,1	35,4	42,63	
	4.1.4	Interior	48,5	47,1	49,1	48,5	48,30	34,38
		Exterior	18,8	18	19,3	25,7	20,45	
	4.1.5	Interior	53,6	49,7	46,3	45,2	48,70	47,40
		Exterior	51	49	46,4	38	46,10	
D1 5.1	5.1.1	Interior	22,5	22,6	21,9	22,5	22,38	31,71
		Exterior	35,1	40,1	44,3	44,7	41,05	
	5.1.2	Interior	50,2	54,6	28,8	46,6	45,05	44,89
		Exterior	55,9	49,9	36	37,1	44,73	
	5.1.3	Interior	55	55,6	53,4	45,7	52,43	53,81
		Exterior	75,5	69,7	37,8	37,8	55,20	
	5.1.4	Interior	48,4	48,2	54,2	52,8	50,90	53,15
		Exterior	60,7	58	54,7	48,2	55,40	
	5.1.5	Interior	53,3	37,9	31,8	35,3	39,57	41,15
		Exterior	54,7	52,1	31,3	32,8	42,73	
D1 6.1	6.1.1	Interior	29,9	30,8	34,6	35,6	32,73	27,98
		Exterior	27,6	20,5	21,1	23,7	23,23	
	6.1.2	Interior	27,2	24,2	18,2	23,2	23,20	20,75
		Exterior	19,3	15,8	17,4	20,7	18,30	
	6.1.3	Interior	37,2	37,1	33,7	38,8	36,70	29,34
		Exterior	28,1	24,4	17,3	18,1	21,98	
	6.1.4	Interior	38,6	43,1	40,9	36,8	39,85	39,76
		Exterior	46,4	43,1	35,3	33,9	39,68	
	6.1.5	Interior	23,5	23,3	27,7	33,9	27,10	27,78
		Exterior	25,3	26,1	27,2	35,2	28,45	
D1 7.1	7.1.1	Interior	30,5	31,4	38,6	38	34,63	32,45
		Exterior	28,5	27,7	31	33,9	30,28	
	7.1.2	Interior	40,1	38	36,9	39,2	38,55	37,72
		Exterior	34,7	35	37,5	40,4	36,90	
	7.1.3	Interior	44,9	48,8	41,1	26,1	40,22	37,61
		Exterior	44,7	35,8	33,4	26,1	35,00	
	7.1.4	Interior	49,4	60,5	57,7	47,5	53,78	51,13
		Exterior	48,4	54,3	47,8	43,4	48,48	
	7.1.5	Interior	48,7	46,1	36,7	36,1	41,90	29,89
		Exterior	22,9	17,2	16,8	14,6	17,87	
	8.1.1	Interior	40,9	34	35	36,2	36,53	36,24
		Exterior	46,2	35,5	27,9	34,2	35,95	
	8.1.2	Interior	47,6	43,4	41,8	37,8	42,65	38,71
		Exterior	36,5	29,3	33,8	39,5	34,78	

D1 8.1	8.1.3	Interior	49,3	52,7	52,7	48,2	50,72	51,06	
		Exterior	52,2	45,2	62,9	45,3	51,40		
	8.1.4	Interior	52,8	54,8	55,8	54,1	54,37	55,26	
		Exterior	58,7	53,2	56,8	55,9	56,15		
	8.1.5	Interior	43,5	44,8	49,3	59,9	49,38	43,74	
		Exterior	35,6	29,9	35,9	51,0	38,10		
D1 9.1	9.1.1	Interior	16,6	16,5	19,0	17,5	17,40	23,85	
		Exterior	29,7	28,4	29,8	33,3	30,30		
	9.1.2	Interior	18,8	20,0	28,0	34,1	25,23	25,71	
		Exterior	15,9	19,6	34,7	34,6	26,20		
	9.1.3	Interior	41,6	36,7	45,1	47,5	42,73	43,71	
		Exterior	45,7	43,6	44,3	45,2	44,70		
	9.1.4	Interior	19,6	15,2	24,8	33,5	23,28	24,64	
		Exterior	37,8	14,5	16,0	35,7	26,00		
	9.1.5	Interior	58,1	57,1	50,4	49,5	53,78	49,78	
		Exterior	55,4	52,0	50,3	25,4	45,78		
	D1 10.1	10.1.1	Interior	33,8	35,9	39,4	42	37,78	31,49
Exterior			20,9	20,4	23,3	36,2	25,20		
10.1.2		Interior	44,1	43,6	36,1	34,6	39,60	37,43	
		Exterior	40,6	37,1	33,4	29,9	35,25		
10.1.3		Interior	51,9	52,5	49,3	42,2	48,97	50,73	
		Exterior	50,2	57,2	47,2	55,3	52,48		
10.1.4		Interior	54,3	55,1	49,6	52,7	52,93	54,75	
		Exterior	60,1	55,3	54,5	56,4	56,58		
10.1.5		Interior	26,9	30,6	37,8	37,7	33,25	31,56	
		Exterior	26,9	25,9	29,6	37,1	29,88		
D1 11.1		11.1.1	Interior	39,7	27,1	24,3	23,2	28,58	23,79
	Exterior		23,6	18,7	17,2	16,5	19,00		
	11.1.2	Interior	35,1	43,1	45,4	49,0	43,15	41,64	
		Exterior	29,5	34,4	45,2	51,4	40,13		
	11.1.3	Interior	21,1	38,6	51,9	47,9	39,88	34,75	
		Exterior	20,6	15,6	27,8	54,5	29,63		
	11.1.4	Interior	49,1	44,8	51,3	55,1	50,07	50,56	
		Exterior	59,3	59,0	48,8	37,1	51,05		
	11.1.5	Interior	45,8	51,7	52,8	45,2	48,88	53,34	
		Exterior	69,0	62,0	54,3	45,9	57,80		
		12.1.1	Interior	45,8	47,8	50,1	40,2	45,97	39,64
Exterior			47,2	36,3	33,6	16,1	33,30		
12.1.2		Interior	35,1	49,4	50,0	50,0	46,13	44,03	
		Exterior	25,9	40,3	51,6	49,9	41,93		

D1 12.1	12.1.3	Interior	49,6	50,7	51,9	61,9	53,53	52,59	
		Exterior	52,0	53,8	55,6	45,2	51,65		
	12.1.4	Interior	44,2	44,9	46,6	47,1	45,70	46,89	
		Exterior	46,1	48,6	48,0	49,6	48,07		
	12.1.5	Interior	53,0	58,6	58,7	47,4	54,43	54,66	
		Exterior	50,2	57,7	57,6	54,1	54,90		
D2 1.2	1.2.1	Interior	49,7	42,1	31,7	30,4	38,48	37,26	
		Exterior	43,8	37,8	32,4	30,2	36,05		
	1.2.2	Interior	42,8	35,6	32,3	25,5	34,05	28,50	
		Exterior	25,5	26	20,5	19,8	22,95		
	1.2.3	Interior	50,5	51	59,4	60,1	55,25	51,51	
		Exterior	47,8	44,2	45,8	53,3	47,78		
	1.2.4	Interior	36,2	60	50,6	49,2	49,00	45,21	
		Exterior	46,5	30,8	39,9	48,5	41,43		
	1.2.5	Interior	51,7	50,7	50,9	45,8	49,78	46,81	
		Exterior	38,5	40,5	45,9	50,5	43,85		
	D2 2.2	2.2.1	Interior	49,8	28,3	23,6	22,4	31,03	30,68
Exterior			50	29	21,9	20,4	30,33		
2.2.2		Interior	50,7	48,5	33,2	24,1	39,13	38,24	
		Exterior	52,2	44,2	28,9	24,1	37,35		
2.2.3		Interior	52,5	52,3	52,3	59,7	54,20	59,53	
		Exterior	47,7	78,2	64,8	68,7	64,85		
2.2.4		Interior	48,7	44	48	47,4	47,03	43,40	
		Exterior	46,5	39,9	38,3	34,4	39,78		
2.2.5		Interior	34,1	35,6	35,7	41,2	36,65	33,93	
		Exterior	26,6	33,9	27,9	36,4	31,20		
D2 3.2		3.2.1	Interior	46,5	45,4	51,4	49,8	48,28	53,95
	Exterior		59,1	60,2	58,7	60,5	59,63		
	3.2.2	Interior	30,5	31,4	34,4	43,5	34,95	26,76	
		Exterior	14,8	17,6	18,5	23,4	18,58		
	3.2.3	Interior	29,3	43	44,7	46	40,75	31,44	
		Exterior	21,7	19,5	21,7	25,6	22,13		
	3.2.4	Interior	45,4	35,7	34,3	37,5	38,22	36,97	
		Exterior	48,1	33,4	31,7	29,7	35,73		
	3.2.5	Interior	40,5	41,8	46,4	50,7	44,85	38,30	
		Exterior	25,6	25,3	35	41,1	31,75		
		4.2.1	Interior	34,3	33,1	36,3	39	35,68	25,44
Exterior			16,9	14,6	14,1	15,2	15,20		
4.2.2		Interior	41,4	29,9	22,2	20,9	28,60	26,83	
		Exterior	32,8	24,9	21,9	20,6	25,05		

D2 4.2	4.2.3	Interior	49,3	49,3	50,3	48,1	49,25	44,20
		Exterior	41,4	41,2	35,2	38,8	39,15	
	4.2.4	Interior	51,2	44,2	37,2	37,1	42,43	42,21
		Exterior	47,7	45,8	40,5	34,0	42,00	
	4.2.5	Interior	46,7	53,9	54,2	50,3	51,28	51,83
		Exterior	51,8	54,5	53,4	49,8	52,38	
D2 5.2	5.2.1	Interior	36,2	35	37,1	42,3	37,65	37,73
		Exterior	38,7	34,7	36,9	40,9	37,80	
	5.2.2	Interior	47,8	43,6	45,2	43,9	45,13	42,79
		Exterior	39,4	38,3	33,5	50,6	40,45	
	5.2.3	Interior	53	55,1	51,7	49,5	52,33	54,46
		Exterior	57,4	51,8	61,1	56,1	56,60	
	5.2.4	Interior	72,7	61,3	55,4	56,3	61,43	55,78
		Exterior	46,9	50,3	45,4	57,9	50,13	
	5.2.5	Interior	51,3	52,7	47	35,5	46,63	41,90
		Exterior	47,4	46,5	29,8	25	37,18	
D2 6.2	6.2.1	Interior	53,5	47,2	48,7	44,6	48,50	33,15
		Exterior	16,7	17,4	17,6	19,5	17,80	
	6.2.2	Interior	53	51,3	49,7	54,2	52,05	49,05
		Exterior	36,5	42	53	52,7	46,05	
	6.2.3	Interior	52	52,4	47,8	52,7	51,22	47,70
		Exterior	30	43	48,3	55,4	44,18	
	6.2.4	Interior	55,5	55,8	53,6	52,9	54,45	53,24
		Exterior	40,7	56,9	56,7	53,8	52,03	
	6.2.5	Interior	51	46,9	56,6	57,4	52,98	41,09
		Exterior	29,8	30	28,9	28,1	29,20	
D2 7.2	7.2.1	Interior	32	35	38,1	43,5	37,15	33,18
		Exterior	31,4	28,7	29,2	27,5	29,20	
	7.2.2	Interior	31,8	34	36,7	41,2	35,93	33,80
		Exterior	24,9	27,9	37	36,9	31,67	
	7.2.3	Interior	54,7	56,2	47,5	46,3	51,18	40,72
		Exterior	20,5	30,9	32,8	36,9	30,28	
	7.2.4	Interior	32	34,3	47,1	44,7	39,53	35,74
		Exterior	21,3	21,9	32,9	51,7	31,95	
	7.2.5	Interior	26,9	36,8	46	47,9	39,40	32,05
		Exterior	20,1	26,1	24,6	28	24,70	
	8.2.1	Interior	27	30,1	35,9	39	33,00	23,75
		Exterior	12,6	16,9	13,8	14,7	14,50	
	8.2.2	Interior	44,8	42	40	39,7	41,63	40,63
		Exterior	44,9	40	36,6	37	39,63	

D2 8.2	8.2.3	Interior	50,2	53,2	54,5	50,9	52,20	37,89
		Exterior	34,2	21,2	22,2	16,7	23,58	
	8.2.4	Interior	40	40,1	31	35,6	36,68	36,03
		Exterior	39,8	34,3	31,2	36,2	35,38	
	8.2.5	Interior	29,3	31,4	39,1	51,1	37,73	28,14
		Exterior	11,9	14,6	21,3	26,4	18,55	
D2 9.2	9.2.1	Interior	28,6	28	26,1	29,7	28,10	24,23
		Exterior	26,9	16,9	17,5	20,1	20,35	
	9.2.2	Interior	31,3	29	27	25,8	28,28	26,90
		Exterior	26,6	25	25,4	25,1	25,53	
	9.2.3	Interior	35,4	51,3	49,5	50,3	46,63	38,39
		Exterior	47,5	40,5	19,3	13,3	30,15	
	9.2.4	Interior	37,9	42,6	41,9	49,4	42,95	34,83
		Exterior	29,5	25,6	25,9	25,8	26,70	
	9.2.5	Interior	31,1	17,4	17,6	19,1	21,30	16,86
		Exterior	11,9	12	12,2	13,6	12,42	
D2 10.2	10.2.1	Interior	55	51,1	51,7	51,2	52,25	53,81
		Exterior	69,4	47,6	50	54,5	55,38	
	10.2.2	Interior	56,6	48,1	47,9	25,8	44,60	46,08
		Exterior	47,9	45,5	47,5	49,3	47,55	
	10.2.3	Interior	45,5	49,3	49,7	44,7	47,30	45,86
		Exterior	45,9	49,3	43,7	38,8	44,43	
	10.2.4	Interior	42,9	49	50	47,2	47,28	49,11
		Exterior	55,7	51,8	48,4	47,9	50,95	
	10.2.5	Interior	43,6	37	33,2	30	35,95	32,71
		Exterior	31,2	30,3	27,5	28,9	29,48	
D2 11.2	11.2.1	Interior	32	35,6	42,1	44	38,43	30,76
		Exterior	12,7	13	22,5	44,2	23,10	
	11.2.2	Interior	25,5	20,3	31,2	30,5	26,88	21,18
		Exterior	12,9	12,3	14,6	22,1	15,48	
	11.2.3	Interior	47,4	51,5	43,9	38	45,20	35,88
		Exterior	46,3	23,1	17,9	18,9	26,55	
	11.2.4	Interior	36,1	36,2	42,8	36,7	37,95	31,68
		Exterior	22,6	22,7	25,7	30,6	25,40	
	11.2.5	Interior	52,5	49	46,9	36	46,10	35,50
		Exterior	40,3	24,4	18,1	16,8	24,90	
	12.2.1	Interior	36	31,9	34,1	35	34,25	28,13
		Exterior	21,7	20	23,8	22,5	22,00	
	12.2.2	Interior	44,4	39,2	36,8	32,8	38,30	35,70
		Exterior	40,7	33,4	30,9	27,4	33,10	

D2 12.2	12.2.3	Interior	50,2	48	52,2	49,6	50,00	45,14
		Exterior	49,2	33,9	30	48	40,28	
	12.2.4	Interior	47,4	46,9	46,8	47,8	47,22	45,29
		Exterior	42	42,8	45,5	43,1	43,35	
	12.2.5	Interior	47,5	50,2	45,5	48,9	48,03	38,20
		Exterior	13,9	17,5	42,7	39,4	28,38	
D3 1.3	1.3.1	Interior	32,9	35,8	45,9	40,8	38,85	37,29
		Exterior	30,2	29,2	42,9	40,6	35,73	
	1.3.2	Interior	45,8	47,6	50,1	52,8	49,08	50,99
		Exterior	66,3	48,7	45	51,6	52,90	
	1.3.3	Interior	50	54,2	59,8	58,7	55,68	53,43
		Exterior	42	50	57,1	55,6	51,18	
	1.3.4	Interior	54,6	50,7	42,9	45,6	48,45	52,45
		Exterior	58,3	57,8	58,7	51	56,45	
	1.3.5	Interior	45,1	47,9	52,5	50,6	49,03	49,99
		Exterior	34,2	43	62	64,6	50,95	
D3 2.3	2.3.1	Interior	39,6	37,9	37,8	28,8	36,03	30,94
		Exterior	24,9	23,9	26,5	28,1	25,85	
	2.3.2	Interior	24,2	24,8	24,4	23,7	24,28	22,43
		Exterior	20,6	19,6	19,2	22,9	20,58	
	2.3.3	Interior	46,4	44,2	38,3	43,6	43,12	44,94
		Exterior	46,5	52,6	49,7	38,2	46,75	
	2.3.4	Interior	38,5	39,8	46,9	42,6	41,95	42,84
		Exterior	52,1	49,1	35,8	37,9	43,73	
	2.3.5	Interior	39,9	50,8	50,9	51,6	48,30	44,84
		Exterior	39,2	34,2	44,4	47,7	41,38	
D3 3.3	3.3.1	Interior	38,8	43,5	50,7	49,8	45,70	40,20
		Exterior	21,2	26,4	45,4	45,8	34,70	
	3.3.2	Interior	32,3	21,6	22,2	23,9	25,00	26,16
		Exterior	28,3	25,7	28,4	26,9	27,33	
	3.3.3	Interior	47,4	49,4	58,1	47,5	50,60	53,76
		Exterior	49,4	57,1	63,1	58,1	56,93	
	3.3.4	Interior	46	46	45,9	48	46,48	46,26
		Exterior	43,6	46,3	47,3	47	46,05	
	3.3.5	Interior	51,4	51,3	49,6	48,9	50,30	48,60
		Exterior	47	42,8	50,7	47,1	46,90	
D3 4.3	4.3.1	Interior	46,9	40,3	34,2	27,9	37,32	31,74
		Exterior	39,5	29,8	18,7	16,6	26,15	
	4.3.2	Interior	20,8	28,3	40,7	47,4	34,30	35,36
		Exterior	20,3	30,4	43,8	51,2	36,43	
	4.3.3	Interior	38	31	31,6	35	33,90	32,80
		Exterior	41,6	24,2	23,6	37,4	31,70	

	4.3.4	Interior	37,9	42,9	45	46,2	43,00	42,58	
		Exterior	30,8	34,3	50,6	52,9	42,15		
	4.3.5	Interior	33,9	32,3	42	51,9	40,03	29,73	
		Exterior	18	16,4	17,5	25,8	19,43		
D3 5.3	5.3.1	Interior	51,5	40	42,8	42,1	44,10	31,73	
		Exterior	18	15,8	14,7	28,9	19,35		
	5.3.2	Interior	38,3	41,5	43,3	47,5	42,65	38,72	
		Exterior	18,4	31	42,1	47,7	34,80		
	5.3.3	Interior	32	47,7	50	51,8	45,38	41,58	
		Exterior	27,1	34,1	42,2	47,7	37,78		
	5.3.4	Interior	50,3	56,4	56	57,2	54,97	45,16	
		Exterior	41,5	32	30,7	37,2	35,35		
	5.3.5	Interior	25,2	30,2	29,6	48,7	33,43	34,86	
		Exterior	24,7	28,2	42,4	49,9	36,30		
	D3 6.3	6.3.1	Interior	21,2	26,8	33,8	38,1	29,98	22,30
Exterior			14,2	13,8	15,1	15,4	14,63		
6.3.2		Interior	21,6	21,9	25,4	30,1	24,75	24,13	
		Exterior	24,9	22,5	23,4	23,2	23,50		
6.3.3		Interior	25,5	45,6	34,7	35,2	35,25	35,45	
		Exterior	32,1	32,3	36,2	42	35,65		
6.3.4		Interior	47,3	44,4	40,3	37,8	42,45	38,89	
		Exterior	44,4	40,8	27,6	28,5	35,32		
6.3.5		Interior	48,3	45,4	42,5	38,3	43,63	37,33	
		Exterior	30,5	38,3	28,1	27,2	31,03		
D3 7.3		7.3.1	Interior	49,5	35,5	39,1	36,5	40,15	39,38
	Exterior		47,2	36,9	34,6	35,7	38,60		
	7.3.2	Interior	40,7	36,5	24,6	15,7	29,38	30,28	
		Exterior	48,3	38,8	18,9	18,7	31,18		
	7.3.3	Interior	45,4	52,2	46,9	43,7	47,05	46,89	
		Exterior	50,5	48,9	52,4	35,1	46,73		
	7.3.4	Interior	44	46,8	50,6	38,7	45,03	48,26	
		Exterior	44,8	43,5	57,3	60,4	51,50		
	7.3.5	Interior	54,3	42,8	43	44	46,03	43,70	
		Exterior	58,4	44,7	34,6	27,8	41,38		
	D3 8.3	8.3.1	Interior	55,2	49,7	38,2	40,3	45,85	46,78
Exterior			54,1	55,8	40,5	40,4	47,70		
8.3.2		Interior	51,4	48,5	41,4	31,9	43,30	40,65	
		Exterior	54,2	40,7	37,5	19,6	38,00		
8.3.3		Interior	50	48,4	47,2	47,1	48,18	45,39	
		Exterior	52,7	41,8	31,1	44,8	42,60		

	8.3.4	Interior	41,2	42,4	43	40,6	41,80	42,28	
		Exterior	55,1	39,4	36,3	40,2	42,75		
	8.3.5	Interior	58,9	55,3	51,8	50,1	54,03	53,31	
		Exterior	58,2	53,4	51,2	47,6	52,60		
D3 9.3	9.3.1	Interior	26	20,3	18,7	17,5	20,63	20,09	
		Exterior	19,1	18,9	19,5	20,7	19,55		
	9.3.2	Interior	27,6	26,3	30	25,8	27,43	24,33	
		Exterior	21,3	21,6	21,1	20,9	21,23		
	9.3.3	Interior	45,9	50,1	46,8	46,7	47,38	48,38	
		Exterior	51,1	52,6	50	43,8	49,38		
	9.3.4	Interior	44,6	40,9	40,7	43,6	42,45	43,04	
		Exterior	46,5	41,8	42,2	44	43,63		
	9.3.5	Interior	47,4	46	52	51,3	49,18	46,60	
		Exterior	39	42,7	45,1	49,3	44,03		
	D3 10.3	10.3.1	Interior	49,5	36,6	29,8	29	36,22	31,75
Exterior			19,3	28,3	33,3	28,2	27,28		
10.3.2		Interior	44,3	36,5	32,6	28,1	35,38	34,33	
		Exterior	47,1	33,7	26,3	26	33,28		
10.3.3		Interior	49	47,5	44,5	55,4	49,10	42,24	
		Exterior	41	37,8	35,1	27,6	35,38		
10.3.4		Interior	49,9	50,3	47,6	43,8	47,90	42,72	
		Exterior	38,9	34,4	38,9	38	37,55		
10.3.5		Interior	45,4	47	54,3	54,7	50,35	41,59	
		Exterior	20	28,6	35,7	47	32,83		
D3 11.3		11.3.1	Interior	38,6	36,2	34	36,6	36,35	26,39
	Exterior		19,3	18,1	17,7	10,6	16,43		
	11.3.2	Interior	53,3	55,3	45,9	42,4	49,23	39,61	
		Exterior	31,8	37,9	24,8	25,5	30,00		
	11.3.3	Interior	43,7	43,3	45,5	43,8	44,08	41,35	
		Exterior	41,4	43	41,2	28,9	38,63		
	11.3.4	Interior	48,3	48,8	44,9	49	47,75	34,38	
		Exterior	28,4	17,6	19,6	18,4	21,00		
	11.3.5	Interior	50,9	51,7	49,4	45,7	49,43	32,53	
		Exterior	21,8	16,1	12,8	11,8	15,63		
		12.3.1	Interior	39,3	34,7	33,1	28,1	33,80	26,79
Exterior			29	19,1	17,2	13,8	19,78		
12.3.2		Interior	30,1	27,8	28,4	30,2	29,13	24,85	
		Exterior	27,2	20,8	20,7	13,6	20,58		

D3 12.3	12.3.3	Interior	38,5	39,6	33,8	33,9	36,45	30,44
		Exterior	29,1	20,6	22,9	25,1	24,42	
	12.3.4	Interior	42,4	44,1	46,8	46,1	44,85	45,33
		Exterior	45,6	53	43,9	40,7	45,80	
	12.3.5	Interior	39,5	45,9	48,8	44,4	44,65	32,15
		Exterior	12,7	16	16,3	33,6	19,65	
D3 13.3	13.3.1	Interior	41,7	32,6	26,8	25,1	31,55	25,76
		Exterior	24,4	19,2	18,9	17,4	19,97	
	13.3.2	Interior	21,6	21,5	23,9	27,3	23,58	22,99
		Exterior	24	23	20	22,6	22,40	
	13.3.3	Interior	42,7	52,5	52,4	45,4	48,25	41,86
		Exterior	32,7	31,5	43,6	34,1	35,48	
	13.3.4	Interior	52,4	55,3	54,4	60,3	55,60	47,80
		Exterior	39	34,3	40,7	46	40,00	
	13.3.5	Interior	51,2	52,4	42,6	39,3	46,38	41,79
		Exterior	43,9	48,3	33,5	23,1	37,20	